

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PATRICIA DE LUCA LIMA

BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DANO AO DNA EM
TILÁPIA DO NILO EXPOSTA ÀS ÁGUAS DA PLANTA DE
TRATAMENTO DE AGROINDÚSTRIA DE SUÍNOS

Florianópolis

2004

Patrícia de Luca Lima

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DANO AO DNA EM
TILÁPIA DO NILO EXPOSTAS ÀS ÁGUAS DA PLANTA DE
TRATAMENTO DE AGROINDÚSTRIA DE SUÍNOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau
de Mestre em Biotecnologia**

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Florianópolis

2004

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao **Prof. Dr. Danilo**, pela orientação, confiança e horas de dedicação em mim depositadas.

À **Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa**, pelo otimismo, carinho, dedicação, sugestões, durante todo o processo.

Ao **Prof. Carlos H. L. Soares**, pelos conselhos de criação e tratamento de peixes, tão importante neste trabalho.

Ao **Prof. Jacir Dal Magro**, pelo fornecimento dos efluentes, para realização deste trabalho.

Aos **professores da biotecnologia**, que passaram seu conhecimento e amizade durante o curso.

Ao **Prof. Mário Steindel**, que auxiliou no manuseio e uso do microscópio de fluorescência para realização dos ensaios de cometa.

Ao amigo **Jean Benassi**, companheiro de trabalho, grande amigo; sua presença durante estes anos foi fundamental, para o meu crescimento como pessoal e profissional.

Às amigas **Anabelle e Ivana**, pela amizade, presença nos momentos mais diversos.

Ao pessoal do Laboratório de Ecofisiologia: **Fabíola, Tiago, Maria Cláudia, Alexandre Zotis**, pela amizade e ajuda oferecida durante todo período do experimento.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica Respiratória, pela amizade e toda ajuda oferecida durante o período experimental.

Aos meus pais, que com carinho, amor e dedicação, formaram uma base sólida para que a caminhada em busca de meus objetivos fosse menos complicada.

Ao **Nelson e Maria Clara Greff**, tão presentes, companheiros, otimistas, ajudaram-me com palavras de sabedoria, a conquistar o meu objetivo.

Às minhas **irmãs Priscila, Luciana, Alexandra e Rayama**, que mesmo de longe, sempre torceram pela minha felicidade e vitória.

A você meu amigo, companheiro, amor **DIEGO**, por toda confiança depositada em mim desde o começo, esta conquista é nossa.

Ao meu filho **LYAM**, que me acompanhou durante parte dos experimentos, e me deu demonstrações de coragem e perseverança .

Ao **CNPq**, que concedeu uma bolsa de mestrado, a qual foi muito importante para mim durante todo o período.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, e para minha formação como profissional.

**"Assim eu compreendi que não há nada melhor
do que a gente ter prazer no trabalho."**

Eclesiastes 3:22

Este trabalho foi realizado em conjunto nos Laboratórios de Ecofisiologia Respiratória e Bioquímica Experimental, com a orientação do Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho (Departamento de Ecologia e Zoologia), e co-orientação da Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa (Departamento de Bioquímica), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Apoio financeiro CNPq, com bolsa CT-Hidro - Mestrado.

RESUMO

Os biomarcadores de dano ao DNA (teste Cometa), níveis de lipoperoxidação (TBARS) e biomarcadores de estresse oxidativo, como, catalase (CAT), glutationala peroxidase (GPx), glutationala redutase (GR), glutationala S-transferase (GST), e conteúdos de glutationala reduzida, oxidada e total (GSH, GSSG,GT), foram analisados em sangue (teste Cometa) e fígado de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), exposta por 7, 15, 30 (exposição sub-crônica), 60 e 90 dias (exposição crônica) a duas lagoas do sistema de processamento de agroindústria de suínos, sendo a primeira lagoa anaeróbia e a última lagoa de polimento. As atividades das enzimas CAT, GPx e GST foram induzidas durante o período experimental, enquanto a atividade da GR apresentou-se induzida com 7 dias e inibida aos 90 dias na lagoa anaeróbia, e na lagoa de polimento sua atividade apresentou-se inibida até 15 dias e induzida com 90 dias de exposição. Os níveis de GSH aumentaram na lagoa de polimento aos 90 dias de exposição. Os níveis de GSSG apresentaram-se elevados durante todo o período experimental nas duas lagoas, enquanto que os níveis de GT mostraram aumentos significativos na lagoa anaeróbia com 60 dias e na lagoa de polimento com 60 e 90 dias. A lipoperoxidação aumentou durante todo o período experimental, assim como o dano ao DNA avaliado pelo teste Cometa. Os resultados sugerem um comportamento bifásico dos biomarcadores de estresse oxidativo e de dano ao DNA. Aparentemente, durante o primeiro e segundo mês de exposição, existe uma transição das respostas antioxidantes, onde a maioria dos parâmetros diminui e alguns alcançaram igualdade aos controles e, após exposição mais prolongada (2 e 3 meses) os peixes apresentam uma capacidade antioxidante compensatória mais persistente e acentuada.

ABSTRACT

DNA damage (Comet assay), lipoperoxidation levels (TBARS) and several biomarkers of oxidative stress such as catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), and contents of reduced and total (TG) glutathione, were measured in blood (Comet assay) and liver of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to 7, 15, 30 (sub-chronic exposition), 60 and 90 days (chronic exposition) to two lagoons of the a swine processing system, a first anaerobic lagoon and a final polishment lagoon. The CAT, GPx and GST activities were increased during the experimental period in tilapia exposed to both lagoons, while GR activities were increased after 7 days and decreased after 90 days of exposure to the anaerobic lagoon, and were decreased until 15 days of exposure and increased after 90 days. GSH contents were increased only after 90 days of exposure to the polishment lagoon. GSSG contents were augmented after exposure to both lagoons during the experimental period, while total glutathione contents showed increased values after 60 days of exposure to the anaerobic lagoon and after 60 and 90 days to the polishment lagoon. TBARS contents and DNA damage were increased during the experimental period. The results suggest a biphasic profile of biomarkers of oxidative stress and DNA damage. Apparently, after the first and second months of exposure, there is a transition regarding the antioxidant responses. In other words, most of these responses were decreased near control levels, and after chronic (2-3 months) tilapia exposed to both lagoons showed a higher and persistent antioxidant capacity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Plantel de suínos nas regiões do Brasil-----	3
Figura 2: Região oeste de Santa Catarina, principais bacias hidrográficas -----	5
Figura 3 : Esquema do processo de lipo-peroxidação (LPO) -----	14
Figura 4: Esquema do sistema de defesas antioxidantes associada à glutathiona -----	18
Figura 5: Fluxograma da planta de processamento da agroindústria de suínos, com os pontos de coleta das amostras -----	23
Figura 6: <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia do Nilo) -----	27
Figura 7: Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> -----	36
Figura 8: Teste de toxicidade aguda até 7 dias tilápia do Nilo-----	37
Figura 9: Índice somático de fígado de tilápia do Nilo exposta aos efluentes -----	38
Figura 10: Níveis de lipoperoxidação em fígado de tilápia do Nilo exposta por 7, 15, 30, 60 e 90 dias aos efluentes da lagoa anaeróbia e da lagoa polimento-----	39
Figura11: Dano ao DNA em sangue de tilápia do Nilo exposta por 7, 15, 30, 60 e 90 -----	41
Figura 12: Níveis de glutathiona oxidada em fígado de tilápia do Nilo exposta por 7, 15, 30, 60 e 90 dias aos efluentes -----	42
Figura 13: Atividade da catalase em fígado de Tilápia expostas aos efluentes-----	43
Figura 14: Atividade da GPx em fígado de tilápia do Nilo exposta aos efluentes -----	44
Figura 15: Atividade da glutathiona redutase no fígado de tilápia do Nilo exposta por 7, 15, 30, 60 e 90 dias aos efluentes -----	45
Figura 16: Atividade da glutathiona S- transferase no fígado de tilápia do Nilo exposta por 7, 15, 30, 60 e 90 dias aos efluentes -----	46
Figura 17: Nível da glutathiona reduzida em fígado de tilápia do Nilo exposta por 7, 15, 30, 60 e 90 dias aos efluentes -----	47
Figura 18: Nível de glutathiona total em tilápia do Nilo exposta por 7, 15, 30, 60 e 90 dias aos efluentes -----	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção mundial de carne suína, nos anos de 2002 e 2003-----	2
Tabela 2: Consumo de carne no Brasil-----	3
Tabela 3: Exportação brasileira de carne suína-----	4
Tabela 4: Principais agroindústrias do país com a quantidade cabeças de suínos abatidas em 2003, e participação da empresa no mercado nacional -----	4
Tabela 5: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio -----	9
Tabela 6: Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada -----	31
Tabela 7: Parâmetros físico-químicos dos efluentes de agroindústria de suínos -----	35
Tabela 8: Porcentagem de células com e sem cometas distribuída por classes-----	40

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Suinocultura	1
1.1.1. A suinocultura num contexto mundial, nacional e estadual	1
1.1.2. Suinocultura em santa catarina	5
1.1.3. Suinocultura e o meio ambiente	6
1.2. Definição e geração de radicais livres	8
1.3. Biomarcadores	13
1.4. Biomarcadores de dano	13
1.4.1. Peroxidação lipídica	13
1.4.2. Dano ao DNA	14
1.5. Biomarcadores de estresse oxidativo	15
1.5.1. Defesas Antioxidantes	15
1.5.1.1. Superóxido dismutase	16
1.5.1.2. Catalase	16
1.5.1.3. Glutaciona peroxidase	17
1.5.1.4. Glutaciona redutase	17
1.5.1.5. Glutaciona S-transferase	17
1.5.2. Sistema tiól redox antioxidante	18
1.5.2.1. Glutaciona reduzida	18
2. OBJETIVO	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivo específico	20

3. METODOLOGIA	22
3.1. Coleta das amostras de efluentes	22
3.1.1. Sistema de tratamento empregado pela industria	22
3.2. Análise físico-química dos efluentes	24
3.3. Testes de toxicidade aguda	24
3.3.1. <i>Daphnia magna</i>	24
3.3.1.1. Cultivo dos dafnídeos	24
3.3.1.2. Testes de toxicidade aguda <i>Daphnia magna</i>	25
3.3.2. Teste de toxicidade aguda e sub-crônica com peixes	26
3.4. Protocolo experimental	26
3.4.1. Animais	26
3.4.2. Exposição dos peixes	27
3.4.3. Coleta dos tecidos para análise	28
3.4.4. Índice somático do fígado	28
3.4.5. Preparação das amostras	29
3.4.5.1. Homogenatos	29
3.4.5.2. Extrato ácido	29
3.5. Biomarcadores de dano	29
3.5.1. Avaliação da lipoperoxidação tecidual (TBARS)	29
3.5.2. Avaliação de dano ao DNA (teste Cometa)	30
3.6. Biomarcadores de estresse oxidativo	32
3.6.1. Avaliação dos antioxidantes enzimáticos	32
3.6.1.1. Catalase (CAT)	32
3.6.1.2. Glutathiona peroxidase (GPx)	32
3.6.1.3. Glutathiona redutase (GR)	33

3.6.1.4. Glutationa S-transferase (GST)-----	33
3.6.2. Defesas antioxidantes não enzimáticas (tióis não protéicos) -----	33
3.6.2.1. Glutationa reduzida (GSH)-----	33
3.6.2.2. Glutationa total (GT) e (GSSG)-----	34
3.7. Análises estatísticas -----	34
4.RESULTADOS -----	35
4.1. Análises físico-químicas -----	35
4.2. Teste de toxicidade -----	36
4.2.1. <i>Daphnia magna</i> -----	36
4.2.2. Tilápia do Nilo -----	37
4.3. Avaliação do índice somático-----	38
4.4. Análise de biomarcadores de dano-----	39
4.4.1. Análise de lipoperoxidação (TBARS)-----	39
4.4.2. Avaliação de genotoxicidade (teste Cometa)-----	40
4.4.3. Glutationa oxidada (GSSG)-----	42
4.5. Biomarcadores de estresse oxidativo -----	43
4.5.1. Catalase -----	43
4.5.2. Glutationa peroxidase -----	44
4.5.3. Glutationa redutase -----	45
4.5.4. Glutationa S-transferase -----	46
4.6. Defesa antioxidante não enzimática -----	47
4.6.1. Glutationa reduzida-----	47
4.6.2. Glutationa total-----	48
5. DISCUSSÃO -----	49
6. CONCLUSÕES -----	60

7. PERSPECTIVAS FUTURAS ----- 61

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- 62

1. INTRODUÇÃO

1.1. SUINOCULTURA

1.1.1. A suinocultura no contexto mundial, nacional e estadual

Segundo a USDA (Departamento da Agricultura dos Estados Unidos), em 2003 a produção mundial de carne de suínos foi de, aproximadamente, 87,2 milhões de toneladas, sendo que 44,1 milhões de toneladas foram produzidas pela China, a qual representa cerca de 50,5% da produção mundial. Em seguida, a União Européia, com a segunda maior produção mundial de 20,4%, e em terceiro, os EUA apresentando cerca de 10,2% da produção. Já o Brasil comparece em quarto lugar no mercado mundial correspondendo a cerca de 2,9% da produção mundial, sendo o maior exportador e produtor da América Latina (Tabela 1). Os grandes produtores de carne suína também são os grandes consumidores, os quais garantem o próprio abastecimento e preços mais competitivos. A carne suína tem grande aceitação de consumo no mercado mundial, representando 43% de participação no total geral de consumo de carnes; em segundo lugar vem a carne de frango com 30% de participação no consumo, e finalmente, a carne bovina, a qual participa com 27% de consumo no mercado mundial. A carne suína é consumida principalmente na forma *in natura*, por apresentar preços baixos em relação à industrializada.

A suinocultura é uma atividade que está presente em 46,5% das propriedades existentes no Brasil. Estima-se que atualmente 733 mil pessoas dependam diretamente da cadeia produtiva da suinocultura brasileira, sendo responsável pela renda de 2,7 milhões de brasileiros (Roppa, 1999). Segundo o BNDES, em 1994 o Brasil detinha no mercado mundial um rebanho de suínos com cerca de 33,1 milhões de cabeças, chegando a 36,5 milhões de cabeças em 1999 (Roppa, 1999), representando assim, 57% do rebanho da América do Sul.

Tabela 1: Produção mundial de carne suína, nos anos de 2002 e 2003, em diferentes países.

PRODUÇÃO MUNDIAL DE CARNE SUÍNA [em milhões de toneladas (**)]		
PAÍS	2002	2003
China	43,2	44,1
União Européia	17,8	17,8
EUA	8,6	8,9
Brasil	2,5	2,6
Canadá	1,8	1,9
Fed. Russa	1,6	1,7
Polônia	1,6	1,7
Japão	1,2	1,2
Outros países	7,0	7,1
Total	86,0	87,2

Fonte: USDA/2004

Nota: (** Equivalente carcaça)

A maior concentração de suínos está presente na região sul do país, a qual detém 35% do total, seguido pela região nordeste com 25%, sudeste 20%, centro-oeste 13% e norte 7%. Quanto à produção de industrializados de carne suína, a região sul apresenta aproximadamente 65% da produção brasileira, seguida pelo sudeste 26% e nordeste 5%, (Figura 1).

A diferença na produção de industrializados derivados da carne suína nestas regiões, se dá pelas características dos sistemas de produção, em níveis tecnológicos e gerências, isto é, nas regiões norte e nordeste, a suinocultura desenvolve-se em moldes tradicionais e de subsistência, já nas regiões sul e sudeste, a atividade é desenvolvida com tecnologia moderna, (Peetz, 1996). Na região sul a suinocultura tem um enfoque estritamente comercial, onde a maior parte dos animais produzidos é comercializada através de contratos (no sistema de integração entre produtores e empresas), isto acontece principalmente no oeste catarinense.

Razões históricas explicam essa diferença na forma de produção. A implantação da suinocultura foi localizada distante de centros consumidores da região sudoeste, e na época, os meios de transporte eram precários para levar o produto a longas distâncias num curto espaço de tempo. A saída foi processar essa carne e vendê-la como embutidos, que trazia

também a vantagem de maior valor agregado para a indústria. Hoje, 70% da carne suína é consumida no país na forma industrializada.

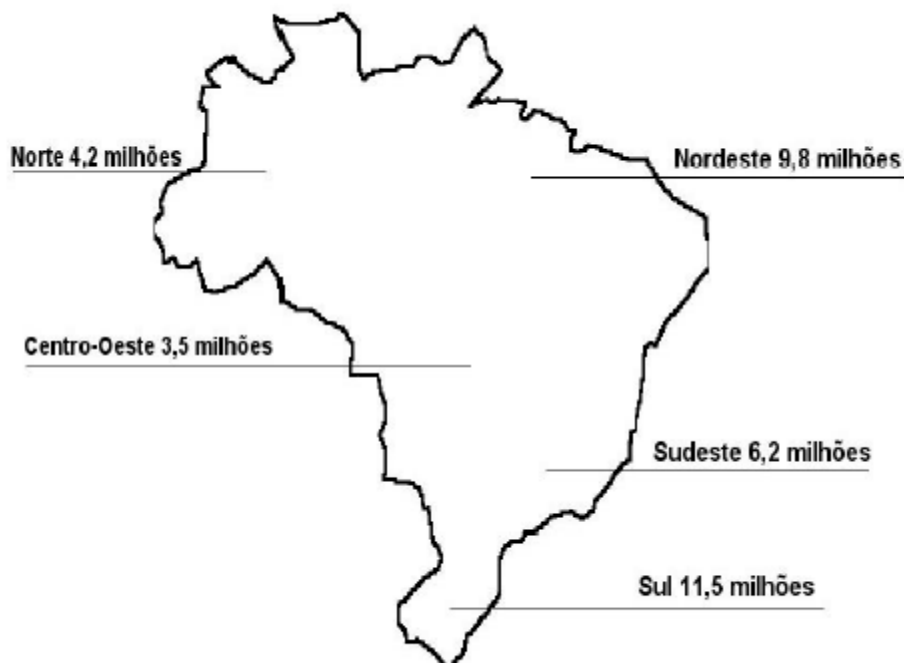


Figura 1: Plantel de suínos nas regiões do Brasil.

Fonte: Roppa, 1999.

Quanto à exploração da suinocultura em relação ao meio ambiente, a região sul exibe índices de produtividade bem elevados, mas apresenta grandes problemas ambientais, enquanto a região nordeste mostra baixos índices de produtividade e também de sanidade. Por outro lado, o consumo de carne suína no país é superado pela carne de gado e aves, sendo consumida principalmente na forma industrializada (Tabela 2).

Tabela 2: Consumo de diferentes tipos de carnes.

CONSUMO DE CARNES NO BRASIL, 1997	
Carne	Kg./hab./ano
Bovinos	29,6
Frangos	23,4
Suínos	9,2
Outros	37,8
Total	100,0

Fonte: BNDS, 1997.

Dados preliminares divulgados pela SECEX mostraram que as exportações brasileiras de carne suína de 2003 até março de 2004, foram em torno de 460,52 toneladas (Tabela 3). As exportações brasileiras representaram 22 % do total produzido no ano, onde basicamente exportamos para a Argentina, Hong Kong e um pouco para o Uruguai, sendo o restante referente ao consumo interno.

Tabela 3: Exportação brasileira de carne suína, de 2002 a 2004.

EXPORTAÇÕES BRASILEIRAS DE CARNE SUÍNA (em toneladas)		
Trimestre	2002/2003	2003/2004
2º Trimestre 2003	103,1	109,3
3º Trimestre 2003	145,1	133,9
4º Trimestre 2003	143,6	122,7
1º Trimestre 2004	116,4	85,4

Fonte: ABIPECS/SECEX, 2004

As 10 maiores empresas abatedoras e exportadoras de suínos em 2003, segundo a ABIPECS (Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína), foram: Sadia-Concórdia S/A, Perdigão Agro-Industrial S/A, Aurora-Cooperativa do Oeste Catarinense, Seara S/A, estando presentes no estado de Santa Catarina as cinco principais empresas (Tabela 4).

Tabela 4: Principais agroindústrias do país com a quantidade cabeças de suínos abatidas em 2003 e participação da empresa no mercado nacional.

AGROINDÚSTRIA	CABEÇAS ABATIDAS (2003)	PARTICIPAÇÃO (%)
Sadia*	4000	11,33
Perdigão*	3000	8,07
Aurora*	2500	7,18
Seara*	1650	4,65
Riosulense*	1050	2,97
Frig. Rajá	800	2,21
Frangosul	750	2,10
Avipal	550	1,50
Sudcoop	400	1,07
Pif Paf	370	1,05

Fonte: ABIPECS, 2004.

Nota: * Empresas instaladas no estado de Santa Catarina.

1.1.2. Suinocultura em Santa Catarina

A suinocultura empresarial está presente em grande escala na região sul do País, destacando-se a região oeste de Santa Catarina, nesta região está presente a bacia hidrográfica do rio Uruguai (Figura 2). Segundo Coutinho (1993), em Santa Catarina, a suinocultura está concentrada nas micro-regiões do oeste catarinense e do Vale do Rio do Peixe, responsáveis por mais de 95% do abate, destacando-se as cidades de Chapecó, Joaçaba e Concórdia. O sistema integrado, introduzido no oeste catarinense na década de 70, é talvez o melhor exemplo no Brasil do processo de terceirização do setor. Ele é utilizado principalmente na produção de frangos, perus e suínos. A idéia básica do sistema de integração é que as agroindústrias fornecem toda a tecnologia a pequenos produtores, que possuem a tarefa de engordar os animais. As indústrias fornecem animais com padrão genético definido, ração especial, remédios e assistência técnica, enquanto os integrados cuidam dos suínos até a hora do abate.

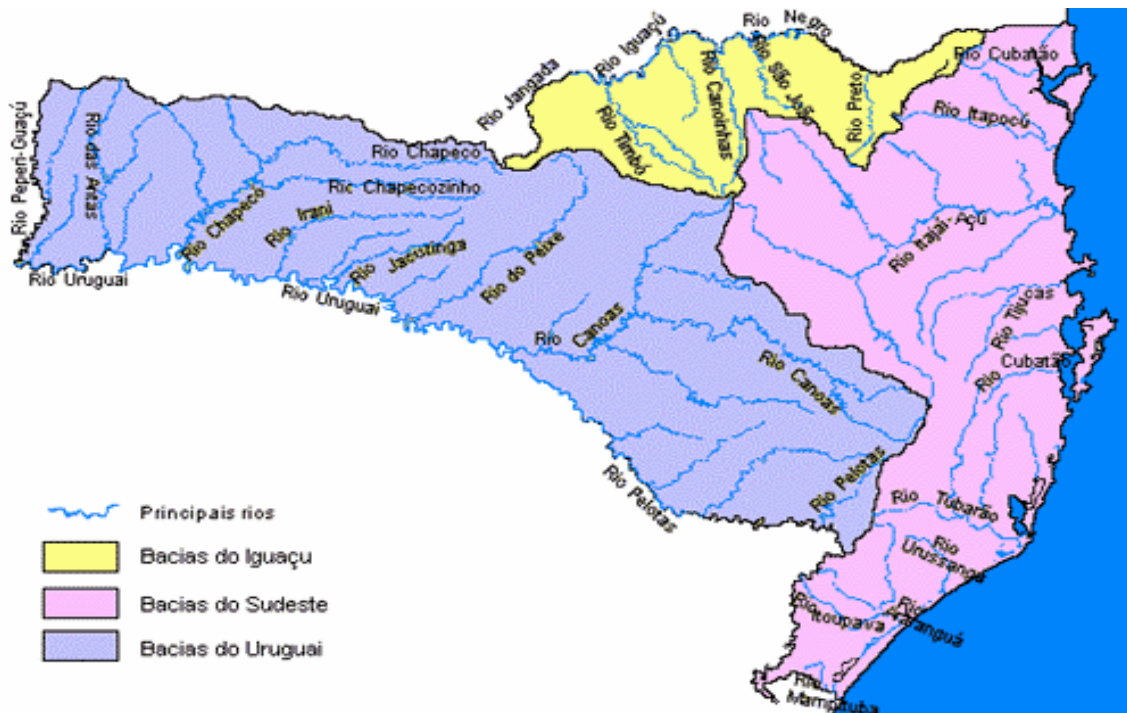


Figura 2: Mapa do estado de Santa Catarina apresentando a região oeste onde se encontram as principais bacias hidrográficas.
Fonte: CASAN, 2004.

Na região oeste de Santa Catarina instalaram-se desde a década de 40, as principais agroindústrias do país, entre elas, Sadia, Perdigão e Aurora. Desta forma, a articulação industrial de Santa Catarina caracterizou-se pela intensificação do processo de integração, com o aumento da produção das próprias agroindústrias, aumento na escala de produção, utilizando um número menor de produtores, processo o qual gerou modernização. Nestas agroindústrias são produzidas cerca de 60% dos produtos industrializados de carne suína consumidos no Brasil, além daqueles que são exportados. Este número tem aumentado gradativamente ao longo dos anos, surgindo assim, uma crescente preocupação ambiental com os efluentes por elas gerados.

1.1.3. Suinocultura e o Meio Ambiente

A questão ambiental tem destaque na esfera da produção de carne suína no estado de Santa Catarina, já que esta produção gera alta quantidade de dejetos contendo principalmente nitritos, nitratos e fósforo, numa forma onde não são assimilados pelas plantas ou bactérias. As condições ambientais e sociais, como relevo acidentado e alta concentração de animais, têm ocasionado sérios problemas de poluição, pois os dejetos derivados da produção acabam sendo liberados no ambiente sem nenhum tratamento, onde podem penetrar no solo e contaminar, além do solo, o lençol freático, ou com o relevo acidentado, escoar para os rios e mananciais. Dentre os principais impactos causados ao meio ambiente, estão aqueles decorrentes do manejo impróprio dos dejetos de suínos, que são gerados em quantidades elevadas em função do sistema de confinamento dos suínos. Estes dejetos são normalmente jogados nos rios, mananciais, ou distribuídos no solo, como fertilizantes.

A poluição dos mananciais da região pode ocorrer de forma premeditada, onde são estabelecidas formas clandestinas de despejo, com conexão subterrânea entre esterqueira e o

rios (Guivant, 1998). A poluição causada pelos dejetos de suínos pode contaminar os solos devido à aplicação de grandes quantidades de esterco líquido, ou pelo armazenamento incorreto em lagoas, que pode provocar a contaminação dos lençóis freáticos. Além disto, o processo de industrialização de alimentos tem causado a acumulação de nitratos, nitritos e fósforo no ambiente. Entretanto, existe uma carência de estudos epidemiológicos que estabeleçam a relação entre as principais doenças e a poluição dos rios relacionados com a suinocultura conforme apontada por vários autores, entre eles Garcia & Beirith (1996).

Dentre os principais compostos presentes nos efluentes da agroindústria de suínos, podemos destacar os nitratos, nitritos, fósforo, cloretos, matéria em suspensão, além de uma série de microorganismos. Com as mudanças no padrão de práticas agrícolas, o processamento de alimentos e a industrialização tem levado a uma acumulação de nitrato/nitrito no meio ambiente. A produção de suínos, assim como a industrialização, vem contribuindo para um aumento de compostos derivados do nitrogênio no solo e nas águas de rios e lagos, entre eles os nitratos e nitritos.

Os nitritos e nitratos são componentes naturais do ciclo do nitrogênio em ecossistemas, e a alta quantidade do mesmo no ambiente é considerado um grande problema, porque os nitritos e os nitratos tem sido documentados como tóxicos para animais (Lewis e Morris, 1986; Shimura et al., 2002). Em baixa concentração, o nitrito é um constituinte natural dos tecidos animais, é produzido endogenamente como um metabólito oxidativo da molécula óxido nítrico, o qual é produzido pelo endotélio capilar, células nervosas e macrófagos ativados devido à resposta a uma inflamação ou infecção (Ellis et al., 1998; Gladwin et al., 2000; Lauer et al., 2001). A entrada do nitrito ou nitrato no organismo pode ser pelo alimento ou pela água (o nitrato é reduzido a nitrito no trato gastrointestinal), sendo que no organismo o nitrito tem a habilidade de formar metahemoglobinemia (metHb), a qual

nos peixes é muito maior que em mamíferos (Wilhelm Filho et al., 2000), além do composto N-nitroso, que é um potencial mutagênico e carcinogênico (Hotchliss et al., 1992)

Os animais aquáticos têm um maior risco de intoxicação por nitritos e nitratos, porque na água ele penetram pelo epitélio branquial e acumulam-se no fluido do corpo. Muitos estudos têm demonstrado que os nitritos/nitratos podem induzir vários distúrbios fisiológicos, graças à sua toxicidade (Jensen, 1995; Shimura, 2002).

O nitrito é um produto intermediário da nitrificação e desnitrificação realizada por bactérias nos ecossistemas. O processo de nitrificação por organismos aeróbicos consiste da oxidação da amônia para nitrito pelo *Nitrosomonas* sp e de nitrito para nitrato pela *Nitrobacter* sp. O processo de desnitrificação é feito por bactérias anaeróbicas facultativas que reduzem o nitrato para nitrito. A baixa concentração de nitritos no ambiente não é poluente, mas um desbalanço na nitrificação e na desnitrificação pode levar ao aumento de nitratos no mesmo.

1.2.. DEFINIÇÃO E GERAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES

Animais e plantas necessitam de oxigênio para produção eficiente de energia. Desta forma, este oxigênio pode levar à formação de espécies altamente reativas, as quais são chamadas de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Como definição, radical livre é qualquer espécie de molécula ou átomo capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons não pareados nos orbitais mais externos (Halliwell e Gutteridge, 1999). Contudo, a produção de radicais livres é estimulada pelo organismo, em condições de estresse e passam a atuar de forma mais incisiva no organismo graças à respiração celular. Paradoxalmente, o oxigênio que sustenta a vida aeróbia ao mesmo tempo é deletério para os organismos aeróbios (Fridovich, 1999). O

oxigênio atinge uma condição tóxica através de suas espécies intermediárias EROs, que reagem com biomoléculas envolvendo-se em diversos processos patológicos, tanto na etiologia como no desenvolvimento destes (Halliwell e Gutteridge, 1999). De forma semelhante, vários contaminantes ambientais são capazes de induzir o estresse oxidativo em animais aquáticos, incluindo os peixes. Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), estresse oxidativo é definido como um desbalanço entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes.

Estresse oxidativo é resultante da produção excessiva de EROs, sendo de considerável interesse para o entendimento da ecotoxicologia (Kappus, 1987; Lemaire et al., 1996). Independente do fato da poluição aquática ser o maior contribuinte ao estresse oxidativo resultante de um ciclo redox dos poluentes, mesmo sem poluição ou biotransformação de xenobióticos existe uma produção constante de EROs/ERNs nos sistemas vivos. (Halliwell e Gutteridge, 1999; Ahmad et al., 2000). Devido à elevada reatividade das EROs/ERNs, tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($\bullet OH$), alcóxil ($RO\bullet$), peróxil ($ROO\bullet$), óxidos de nitrogênio ($NO\bullet$, $NO_2\bullet$) alguns não radicais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a maioria dos componentes celulares são prováveis alvos potenciais de dano oxidativo (Kappus, 1987). Na tabela 5 podemos observar estes radicais e não radicais capazes de reagir diretamente com biomoléculas nos organismos.

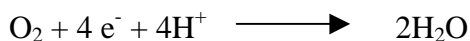
Tabela 5: Principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

RADICAIS	NÃO RADICAIS
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Triclorometil ($CCL_3\bullet$)	Ácido hipocloroso (HOCL)
Hidroxil ($\bullet OH$)	Ácido hipobromoso (HOBr)
Alcoxil ($RO\bullet$)	Ozônio (O_3)
Peróxil ($ROO\bullet$)	Oxigênio singlete (1O_2)
Hidroperóxil ($HO_2\bullet$)	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Óxido nítrico ($NO\bullet$)	Alquil peroxinitrito (ROONO)
Dióxido de nitrogênio ($NO_2\bullet$)	

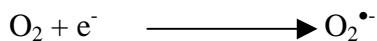
Fonte: Adaptado de Halliwell e Guteridge, 1999.

Cerca de 90% do oxigênio absorvido pelos animais é utilizado pela mitocôndria; onde existe a maior formação de ATP nos animais, e nos tecidos não fotosintetizantes de plantas (Halliwell e Gutteridge, 1999). As EROs apresentam meia vida muito curta, sendo formados *in vivo* durante o metabolismo celular, ou quando um organismo é exposto a estímulos como a radiação ionizante, fármacos, ozônio, contaminantes, biotransformação de xenobióticos, onde sofrem ciclo redox ou formam metabólitos reativos (Comporti, 1989). Quase todo o oxigênio (~98%) é reduzido à água através de transferência de elétrons na cadeia respiratória, sendo catalisada pelo citocromo oxidase na mitocôndria.

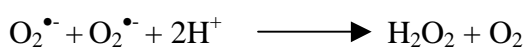
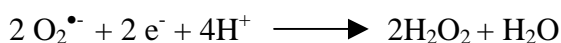
A água, através da citocromo c oxidase, transfere 4 elétrons ao O₂, sem liberação de compostos reativos:



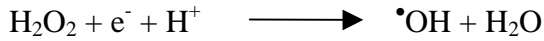
Uma pequena parte de O₂ presente nos organismos (~2%) é reduzida por eventos colisionais randômicos, formando metabólitos reativos, as EROs. Com a redução do O₂ molecular por um elétron, se origina o ânion superóxido (O₂^{•-}) (Halliwell e Gutteridge, 1999):



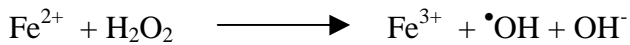
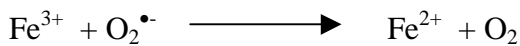
Muitos ânions superóxidos são formados *in vivo* pela atividade de células fagocitárias. Várias enzimas são capazes de reduzir o oxigênio para EROs, entre elas, a xantina oxidase, peroxidases não específicas, e outras (Halliwell e Gutteridge, 1999). A redução do oxigênio resulta na formação de H₂O₂, processo que pode ocorrer através da dismutação de duas moléculas de O₂^{•-}, ou ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) formando peróxido de hidrogênio e H₂O (Farber et al., 1990; Freeman & Crapo, 1982):



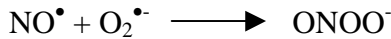
A redução de O₂ por um terceiro elétron resulta na produção do radical hidroxil (•OH) (Di Giulio et al., 1989):



Neste processo geralmente estão envolvidos catalisadores de oxiredução, como metais de transição como o ferro e o cobre (Fe^{+2} e Cu^{+2}), que são representados pela reação de Haber-Weiss e reação de Fenton que são catalisadas pelo ferro ou cobre (Halliwell e Gutteridge, 1999):



Os óxidos de nitrogênio como o dióxido de nitrogênio e o óxido nítrico, (NO^\bullet , NO_2^\bullet), são outros tipos de radicais livres, que interagem com o ânion superóxido para formar peroxinitrito (ONOO^-), (Chow, 2002; Halliwell e Gutteridge, 1999):



O peroxinitrito, apesar de não ser um radical livre, é altamente reativo e difusível, produzido principalmente por macrófagos e neutrófilos ativados (Van Dyke, 1997). Adicionalmente, o peroxinitrito pode ser decomposto para uma forma altamente reativa $\bullet\text{OH}$ ou $\text{NO}_2^{\bullet-}$ (Augusto et al., 1994). Segundo Pryor e Squadrito (1995), o peroxinitrito é um potencial oxidante citotóxico, e, como outros radicais livres, causa lesões teciduais, inibição da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, levando a uma maior geração de EROs (Wallace et al., 1998). Além disto, o peroxinitrito pode inibir ou inativar a atividade da catalase e glutatona peroxidase (Keng et al., 2000; Padmaja et al., 1998), promover a formação de fosfolípidos hidroperóxidos (Shi et al., 1999), ou a modificação da glutatona redutase (Franscucutti et al., 1996).

Os nitratos e nitritos são reconhecidos como compostos chaves na oxidação de produtos para formação de NO^\bullet , o qual pode ser gerado nos tecidos para uma desproporcionalização direta ou pela redução do nitrato e nitrito, presentes em altas quantidades, tanto pela elevada acidez como em casos de isquemia. (Zweier et al., 1999).

As EROs, quando formados, podem reagir com diferentes biomoléculas, causando diferentes tipos de danos aos sistemas biológicos. Desta forma, as aplicações do estresse oxidativo na ecotoxicologia é baseada no paradoxo do oxigênio, pois esta molécula é fundamental para a maioria dos mecanismos bioquímicos dos organismos aeróbicos, mas seu consumo leva a formação intracelular de espécies potencialmente tóxicas como as EROs, que podem ser neutralizadas por um complexo sistema antioxidante (Regoli et al., 2002).

1.3. BIOMARCADORES

A contaminação aquática por efluentes industriais e domésticos é uma constante fonte de preocupação de saúde pública (Maria, 2003). Os tipos de contaminantes variam entre poluentes orgânicos e inorgânicos, possuindo um alto potencial oxidante (Oikari et. al., 1985, Mather-Mihaich & Di Guilio, 1991). Estes contaminantes afetam não somente a fisiologia de organismo (Hontela et al., 1992; Handy, 1994), como também tem o potencial de interação com o DNA (Adams et al., 1992), podendo resultar freqüentemente, no desenvolvimento de tumores (Folmar et al., 1993), ou mutações gênicas (De Flora et al., 1991).

Segundo Adams et al. (1985), os efeitos adversos observados em organismos expostos por um período de tempo maior, pode ser decorrente de uma falha no mecanismo de defesa, aumentando o nível de dano, e que acabam ocasionando maiores injúrias histológicas e fisiológicas. Esse processo pode ser reversível, dependendo da capacidade do órgão ou do tecido afetado de se repor.

O impacto causado por contaminantes originados de efluentes domésticos e industriais pode ser avaliado através de biomarcadores que podem estar associados a diferentes níveis nos sistemas biológicos. Biomarcadores são definidos como uma variação bioquímica, celular, fisiológica, estrutural ou comportamental, que podem ser medidos em amostras de tecido ou fluido do corpo, ou na forma de todo o organismo, que demonstram evidências da exposição e/ou efeito, de um ou mais contaminantes (Depledge, 1993). Os biomarcadores bioquímicos são frequentemente usados para detectar ou diagnosticar efeitos deletérios em peixes expostos a substâncias tóxicas (Toguyeni et al., 1997). Eles podem ser classificados como de efeito ou de exposição. Por definição, biomarcadores de exposição indicam que um organismo ou uma população ficou exposta à um contaminante ou outro estressor. Os biomarcadores de efeito são especificamente associados à ação dos contaminantes sobre organismos vivos, e em muitos casos estão suficientemente bem caracterizados por relacionar-se ao grau de modificações biológicas com o grau dos efeitos adversos. A contínua produção e liberação de contaminantes no meio ambiente, tem resultado no desenvolvimento de técnicas sensíveis para monitorar sua presença.

As manifestações bioquímicas de estresse oxidativo, tanto como oxidação de lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, bem como perturbações no "status redox", podem ser úteis como biomarcadores de efeito e exposição (Huggett et al., 1989).

1.4. BIOMARCADORES DE DANO

1.4.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) é uma série de reações químicas envolvidas na deterioração de ácidos graxos poliinsaturados, que podem perturbar a estrutura e as funções

celulares. Usualmente, ácidos graxos poliinsaturados são atacados por EROs, inicializado e propagando a peroxidação lipídica. Estas espécies reativas podem causar dano em biomoléculas como proteínas, tióis, ácidos nucleicos, iniciando o processo de lipoperoxidação *in vivo* (Duthie, 1993). Este processo é esquematizado na figura 3:

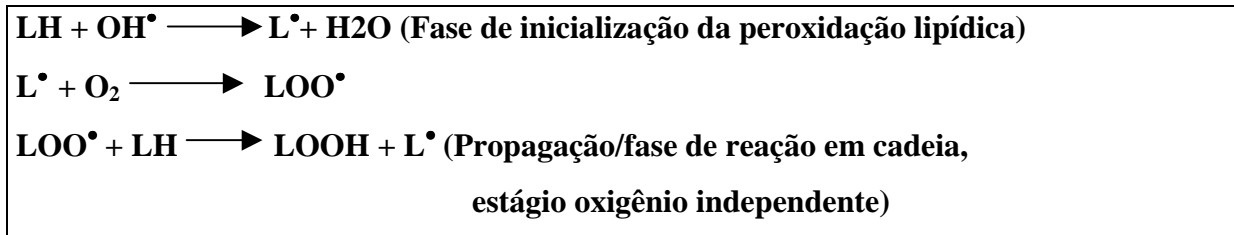


Figura 3: Esquema do processo de lipoperoxidação

Fonte: Adaptado de Dotan et al., 2004.

Os animais aquáticos normalmente contém grande quantia de ácidos graxos poliinsaturados (Huang et al., 2002), ficando desta forma, muito susceptível à LPO.

1.4.2. Dano ao DNA

O DNA é um importante alvo do dano causado pelo aumento de EROs nas células. Os efeitos causados pelo dano ao DNA afetam tanto o sinal da transdução, a proliferação celular, apoptose e a comunicação intercelular. O DNA é uma molécula muito estável, que pode sofrer decomposição química (espontânea) durante seu tempo de vida, sendo que o estresse oxidativo pode acelerar o dano ao DNA, levando a quebra da fita do DNA. Esta quebra é observada em células submetidas ao estresse oxidativo, nos seguintes casos: i) exposição a radiação ionizante, elevadas concentrações de O₂, ao ozônio, e a produtos químicos, além da ativação de células fagocíticas; ii) aumento da concentração de peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, ácido nitroso, hidroperóxidos orgânicos; iii) exposição à xenobióticos (Halliwell e Gutteridge, 1999). As conseqüências do dano ao DNA, causado pelas EROs podem ser tanto

na quebra da fita de DNA, causando a morte celular, como através de modificação das bases nitrogenadas, causando mutações, que podem ocorrer de forma direta, ou durante os vários passos onde a célula passa por replicação ou reparo do dano ao DNA.

O dano oxidativo ao DNA é muito relevante como efeito secundário de muitos contaminantes que podem produzir EROs, como metabólitos do ciclo redox (Lemaire, 1993; Garcia, 1995). O impacto causado pelo dano no organismo poderá ser influenciado tanto pela capacidade antioxidante do organismo (Winston, 1991), quanto pela sua capacidade de reparo (Chaney, 1996). A determinação da quebra na fita de DNA é considerada como um sensível indicador de genotoxicidade (Shugart, 1990), e em geral está correlacionada com as propriedades mutagênicas e carcinogênicas de contaminantes ambientais (Sina, 1983).

1.5. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

1.5.1. DEFESAS ANTIOXIDANTES

A definição de antioxidantes, segundo Halliwell & Gutteridge (1999) é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato, sendo que o substrato oxidável inclui vários tipos de moléculas no organismo. O sistema de defesa antioxidante compreende: i) agentes que removem cataliticamente as EROs e outras espécies de oxigênio, como a superóxido dismutase, catalase, peroxidases e antioxidantes tiol-específicos; ii) proteínas que minimizam o efeito pró-oxidativo, dos íons ferro e cobre e o grupamento heme (metalotioneína, transferrinas, etc.); iii) proteínas que protegem as biomoléculas contra o dano (inclusive o dano oxidativo) por outros mecanismos, como proteínas estressoras; iv) agentes de baixo peso molecular que removem as EROs e os ERNs, por exemplo glutathione, α -tocoferol, bilirubina, etc. (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.5.1.1. Superóxido dismutase (SOD, E.C.: 1.15.1.1)

Está presente em todas as células eucarióticas, estando em maior quantidade no fígado e localizado principalmente no citosol, podendo aparecer nos lisossomos, núcleos, espaços entre e inter membranas mitocondrial, peroxissomos. Apresenta-se com várias isoformas como a (Cu,Zn-SOD) que é uma metaloproteína e a (Mn-SOD). A SOD cataliza a reação que acelera a dismutação do ânion superóxido para forma peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1998). Esta enzima é considerada a mais importante defesa citoprotetora na interceptação das EROs.

1.5.1.2. Catalase (CAT, E.C.: 1.11.1.6)

A dismutação do ânion superóxido gera o peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1999) e esta espécie reativa é decomposta em água e oxigênio pela CAT (Faber et al., 1990). Em animais, a CAT está presente em todos os tecidos, estando principalmente concentrada no tecido hepático e nos eritrócitos, exceção a algumas espécies de peixes acatalassêmicas (Wilhelm Filho, et al., 2000). A atividade catalásica nos tecidos animais e vegetais está principalmente localizada em organelas subcelulares, circundadas por uma membrana simples conhecida como peroxissomas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

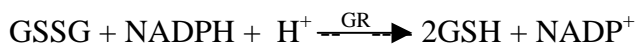
1.5.1.3. Glutationa peroxidase (GPx, E.C.1.11.1.9)

A GPx remove o peróxido de hidrogênio oxidando a GSH. É a mais importante das enzimas peroxidases, que possui selênio no sítio catalítico e utiliza a GSH como doadora de elétrons para a redução de H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos, como os lipoperóxidos

provenientes da lipoperoxidação (Keeling & Smith, 1982). A GPx também impede a formação de meta-hemoglobina, consumindo o peróxido de hidrogênio (Lehninger, 1986).

1.5.1.4. Glutationa redutase (GR, E.C.: 1.6.4.2)

A GR realiza a manutenção celular de GSSG/GSH ao nível normal, catalisando a reação para regeneração da GSH a partir da GSSG, utilizando NADPH (Carlberg et al., 1981).



1.5.1.5. Glutationa S-transferase (GST, E.C.: 2.5.1.18)

A GST catalisa a conjugação de xenobióticos com a GSH, além da neutralização de metabólitos reativos. O fígado é um órgão rico neste tipo de enzima, sendo o resultado dos conjugados com a GSH excretados pela bile e pela na urina. Entre os compostos biotransformado pela GST em animais estão incluídos o clorofórmio, nitratos, fármacos, contaminantes em geral (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.5.2. Sistema tiol-redox antioxidante

1.5.2.1. Glutationa reduzida (GSH)

A GSH é um tiol de baixo peso molecular que se encontra dentro das células, sendo um tripeptídeo importante na proteção da células contra o dano oxidativo e na defesa contra xenobióticos (Uhlig & Wendel, 1992). A GSH é o mais abundante antioxidante tiol intracelular, apresenta-se em concentração aproximadamente milimolar em todas as células

aeróbicas viventes, e sua principal função é como um tampão sulfidril. A GSH também é utilizada na detoxificação de xenobióticos, via reações de conjugação catalisada pela GST (Armstrong, 1997; Van Bladeren, 2000). É um dos mais importantes antioxidantes não-enzimáticos, sendo considerado como uma primeira linha de defesa devido à sua habilidade de ser pronta e continuamente recuperada pelo ciclo da GSH. Na figura 4 pode-se observar todo este sistema antioxidante:

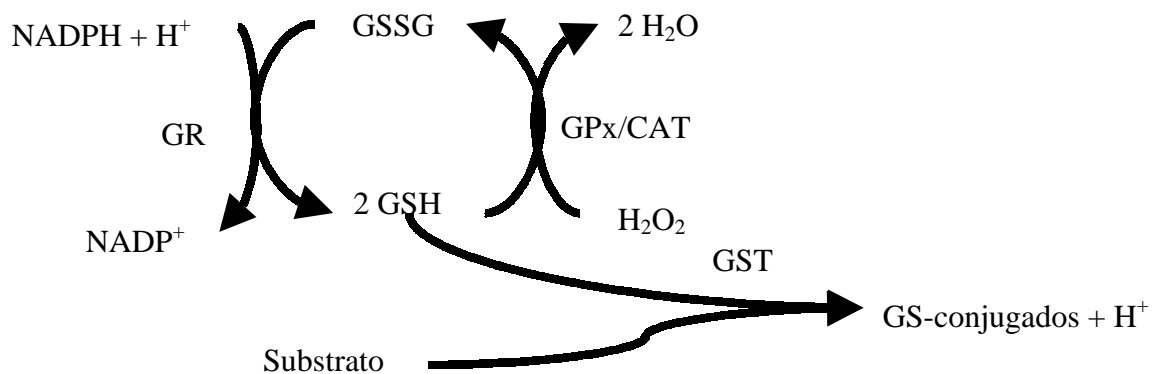


Figura 4: Esquema do sistema de defesas antioxidantes associada à GSH. O peróxido de hidrogênio é reduzido pela GPx e CAT pela oxidação de duas moléculas de GSH, formando a GSSG, que subsequentemente, pode ser reduzida pela GR pelo consumo de NADPH. A GST catalisa a conjugação de GSH com compostos intermediários, funcionando como um intermediário na detoxificação de substâncias tóxicas.

Com o aumento da produção de suínos, além do crescimento de exportação desta carne, surgiram sérios problemas ambientais, oriundos muitas vezes do processamento inadequado dos efluentes gerados nestes processos. Estes efluentes contém uma grande quantidade de compostos que são lançados nos rios, lagos e no solo, os quais podem ser tóxicos para os seres vivos. Surge assim necessidade da avaliação real da sua toxicidade para organismos vivos. Isto pode ser feito através de biomarcadores de estresse oxidativo e biomarcadores de dano, os quais avaliam precocemente os efeitos destes contaminantes para os animais, principalmente os peixes, organismos que estão em contato direto com os efluentes. Já foram avaliados vários efluentes em nosso laboratório, com respeito ao estresse

oxidativo, entre eles, os derivados das indústrias têxtil e de papel e celulose (Rosa, 2003) e carvão mineral (Benassi et al., 2003) utilizando peixes, assim como o diagnóstico ambiental com moluscos (Torres et al., 2002; Lima et al., 2003) demonstrando a eficiência dos biomarcadores de estresse oxidativo na avaliação e monitoramento ambiental.

2.OBJETIVO

2.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das águas das lagoas da planta de tratamento da agroindústria de suínos em *Daphnia magna* e no sistema de defesas antioxidantes, no dano celular e dano ao DNA do peixe tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da exposição sub-crônica (7 e 15 dias) e crônica (30, 60 e 90 dias).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a toxicidade das águas da lagoa anaeróbia e de polimento da planta de tratamento de agroindústria de suínos no microcrustáceo *Daphnia magna*, através da exposição aguda;
- Avaliar o sistema tiol-redox, não-enzimático (GSH, GSSG, GT) no fígado de peixe tilápia do Nilo exposta às águas da lagoa anaeróbia e de polimento da planta de tratamento de agroindústria de suínos;
- Analisar as atividades de antioxidantes enzimáticos (CAT, GPx, GST, GR) no fígado de peixe tilápia do Nilo exposta às águas da lagoa anaeróbia e de polimento da planta de tratamento de agroindústria de suínos;

- Avaliar o dano ao DNA através do teste Cometa, no sangue do peixe tilápia do Nilo, exposta às águas da lagoa anaeróbia e de polimento da planta de tratamento de agroindústria de suínos;

- Verificar os níveis de lipoperoxidação no fígado de peixe tilápia do Nilo exposta às águas da lagoa anaeróbia e de polimento da planta de tratamento de agroindústria de suínos, através do teste de TBARS.

3. METODOLOGIA

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE EFLUENTES DE AGROINDÚSTRIA DE SUÍNOS

3.1.1. Sistema de tratamento empregado pela indústria

As amostras de água foram coletados em um frigorífico de suínos do oeste catarinense, o qual apresenta um processo convencional de tratamento dos efluentes provenientes da indústria de suinocultura. A mesma possui aproximadamente 2000 funcionários e abate cerca de 4000 suínos por dia. A agroindústria apresenta um processo de lagoas de tratamento de seus efluentes, sendo este principalmente físico.

Os efluentes (Figura 5) a serem tratados tem origem em toda indústria (pocilga, indústria propriamente dita e abatedouro), passando desde os processos produtivos até a lavanderia, terminando na estação de tratamento de efluentes, onde passam por um gradeamento, seguindo ao flotor, quando recebem microbolhas de ar em fluxo ascendente, separando a gordura presente em maior quantidade. Após a unidade de flotação, este efluente segue para a unidade de padronização (S.U.), ou caixa de mistura, de onde parte para as lagoas de tratamento. Após a primeira lagoa anaeróbia 1 (primeiro ponto de coleta do efluente), com tempo de retenção de 24 horas, passam para a lagoa anaeróbia 2, com tempo de retenção de 48 horas, e seguem para a lagoa anaeróbia 3, com tempo de retenção de 24 horas. Finalmente, chegam às lagoas aeróbias 1, 2 e 3, com tempo de retenção de 24 horas cada, chegando à última lagoa, chamada de polimento (segundo ponto de coleta de efluente), e nesta lagoa o efluente fica por 15 dias até ser liberado no rio.

Desta forma, a estação de tratamento de efluentes da agroindústria, possui um conjunto de sete lagoas de tratamento, as quais estão organizadas de forma que a água passe de uma para outro por gravidade.

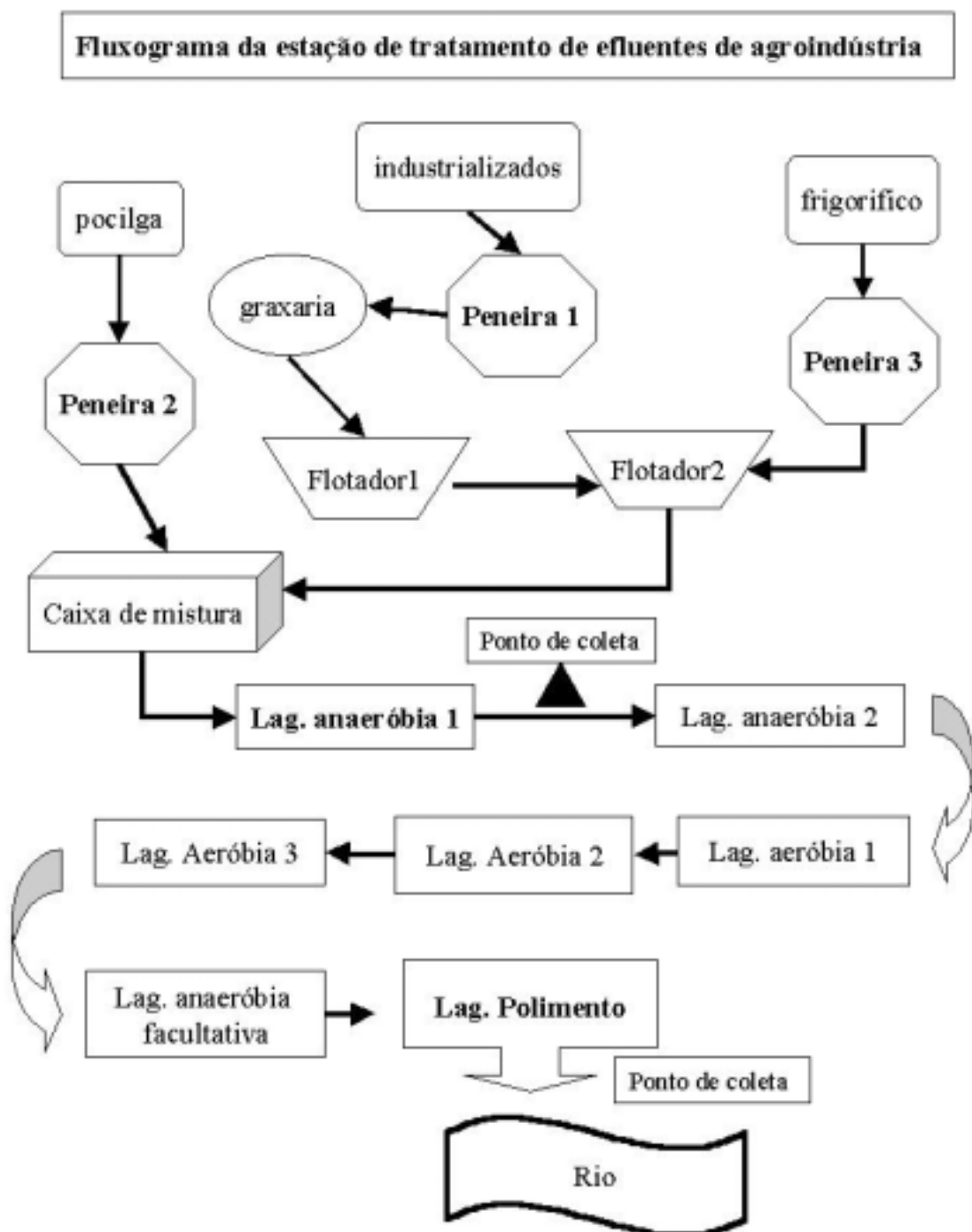


Figura 5: Fluxograma da planta de processamento da agroindústria de suínos, com os dois pontos de coleta das amostras (lagoa anaeróbia e lagoa de polimento).

As amostras dos efluentes analisados foram cedidas pela indústria de suínos localizada no oeste de Santa Catarina. Os efluentes foram coletados às terças feiras, dia de alta produtividade da indústria em pauta. Foram feitas coletas junto à porção final de cada lagoa, sendo elas: lagoa anaeróbia (primeira etapa do tratamento); lagoa de polimento (última etapa do tratamento, efluente final lançado no ambiente) vide (Figura 3). Os efluentes foram coletados seguindo-se as normas do Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB, 1987), em bombonas de polietileno descartáveis, de 50L. Foram transportados para o Laboratório de Bioquímica Experimental/CCB/UFSC, no mesmo dia da coleta, transferidos para bombonas menores (5 litros), preenchidas totalmente com as amostras, de maneira a evitar a presença de ar, e estocadas a uma temperatura de 4°C.

3.2. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS EFLUENTES DE AGROINDÚSTRIA DE SUÍNOS

Os testes físico-químicos (DBO, DQO, nitratos, cloretos, fósforo, nitrogênio, turbidez, sólidos totais, sólidos suspensos, sólidos dissolvidos, sólidos suspensos voláteis, alcalinidade) foram realizados no Laboratório do Centro de Ciências Agroambientais, UNOCHAPECÓ-SC, pelo Prof. Dr. Jacir Dal Magro, e enviados juntamente com os efluentes, estes testes foram realizados seguindo o protocolo da APHA, 1998.

3.3. TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

3.3.1. *Daphnia magna*

As gerações de microcrustáceos, *Daphnia magna* (Crustacea, Phylopoda) foram cultivadas no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica /CCB/UFSC.

Os microcrustáceos foram cultivados seguindo-se as metodologias da CETESB, (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental/Brasil, 1986 e 1987) e norma DIN, (Deutsches Institut für Normung/Alemanha, 1989), com as devidas adaptações para as condições locais (Frello, 1998). Foram utilizados aquários de vidro com capacidade de 2000 ml, com 1500 ml de água de cultivo (meio básico + meio M4), e cerca de 10 a 15 organismos por aquário. Os microcrustáceos foram alimentados diariamente com cultura de algas verdes *Scenedesmus subspicatus*, que foram cultivadas em um fermentador, seguindo-se os procedimentos acima descritos (DIN, 1989; CETESB, 1987). As culturas dos organismos foram mantidas à temperatura de 20 ± 2 °C, com luminosidade em torno de 2000 lux e fotoperíodo de 16h de luz (DIN, 1989). Em dias alternados era realizada a manutenção dos organismos, para um meio de cultivo novo, através de sifonamento com pipetas volumétricas. Diariamente removia-se dos aquários resíduos como carapaças, organismos mortos e depósitos de algas. Semanalmente foram separados os organismos adultos dos jovens, onde estes eram mortos ou descartados (servindo de alimento para peixes), abria-se um novo lote, ou eram utilizados para os testes de toxicidade. Quando a cultura apresentava efípios que é evidenciado por um espessamento na carapaça, de coloração escura, da câmara de incubação das fêmeas adultas, contendo ovos de fertilizados; era descartada.

3.3.1.2. Testes de toxicidade aguda *Daphnia magna* nos efluentes agroindústria de suínos

Os testes foram realizados em beakers de 25 ml, contendo efluentes nas concentrações 100, 75, 50, 25, 12,5, 6 e 0%, (%efluente em meio básico), com água de diluição (meio básico). Em cada becker foram colocados 10 dafnídeos jovens (6 a 24h de vida), que não foram alimentados durante as 48 horas de duração dos testes de toxicidade aguda. Os testes de toxicidade aguda com *D. magna* foram feitos em triplicatas. A partir destes valores

determinaram-se as respectivas CE_{50} (Concentração Efetiva mediana): concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio, através do programa estatístico da Burlington Research-INC, Trimmed Spearman-Karber.

3.3.2. Teste de toxicidade aguda e sub-crônica com peixes

Foi realizado teste de toxicidade aguda 24 e 48 horas, e sub-crônica de 7 dias com o peixe tilápia do Nilo. Os animais foram expostos em diluições seriadas dos efluentes (100, 75, 50, 25, 10%), e o cálculo de CL_{50} foi obtido através de teste estatístico. Foram expostos 10 peixes de cada espécie nas várias diluições em aquários de 50 litros em condições controladas (sistema de claro/escuro natural, temperatura 25°C). As CL_{50} (Concentração Letal da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio), foram feitas pelo programa estatístico da Burlington Research-INC, Trimmed Spearman-Karber.

3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.4.1. Animais

O peixe utilizado neste estudo foi a tilápia do Nilo (Figura 6), o qual se caracteriza como espécie muito conveniente em termos experimentais, por apresentar resistência e sensibilidade adequadas a diferentes oscilações de parâmetros ambientais.



Figura 6: *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo)

Os animais machos, juvenis, foram coletados em uma fazenda de cultivo, na região de Palhoça, pesando $23,5 \pm 1,5$ gramas e medindo $11,7 \pm 0,17$ cm; foram aclimatados em laboratório durante 15 dias em condições controladas (sistema 12:13h claro/escuro, água fresca mantida em temperatura de 25°C , oxigênio dissolvido $\cong 6,0\text{-}7,0$ mg l^{-1} , condutividade $\cong 217$ mS m^{-1}).

3.4.2. Exposição dos peixes

Após estabelecer a CL_{50} (Concentração Letal média), os animais foram expostos ao efluentes utilizando maior concentração da amostra na qual não se observa efeito deletério sobre o organismo-teste, sendo este fator utilizado para efetuar diluição (química), não significando ausência de toxicidade do efluente (ABNT, 2003). Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de exposição e transferidos para aquários de vidro (1 animal para cada 5L de água). De acordo com as concentrações determinadas, um grupo foi exposto a 25% do efluente da lagoa anaeróbia de fase inicial, outro grupo foi exposto a 50% do efluente da lagoa de polimento ou efluente de fase final do tratamento, enquanto o último grupo foi mantido apenas em água sem cloro (controle negativo). A cada 3 dias 2/3 dos efluentes dos aquários eram trocados, e a cada 7 dias todo o efluente dos aquários era inteiramente substituído. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental, apenas não receberam alimentação no dia anterior aos testes. Após os períodos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias

de exposição, 6 animais dos grupos expostos aos efluentes foram sacrificados, pesados em balança analítica e medidos com fita métrica, sendo os peixes controles, sacrificados em número de 2 a 4 peixes por período e exposição. Porções de fígados e sangue foram retirados, no sentido de acompanhar a evolução das defesas antioxidantes e demais parâmetros nos organismos. Considerando que após a realização dos ensaios com os biomarcadores, não foram observadas diferenças estatisticamente significativa, nos valores entre os animais controles, os mesmos foram reunidos num único grupo formando um único grupo controle.

3.4.3. Coleta dos tecidos para análise

Após os períodos de exposição de 7, 15, 30, 60 e 90 dias, os peixes foram mortos por transsecção cefálica, os fígados foram dissecados e mantidos em gelo. As porções utilizadas foram secadas superficialmente com papel-filtro e imediatamente pesadas. O sangue foi coletado via artéria dorsal com seringa heparinizada, e separado para realização do teste Cometa.

3.4.4. Índice somático do fígado

Após a exposição por 7, 15, 30, 60 e 90 dias aos tratamentos, os peixes foram sacrificados e os fígados retirados, seguindo dos processos de pesagem do animal inteiro e do fígado em balança analítica. O índice somático do fígado foi determinado segundo SIlloff et al. (1983), sendo obtido conforme a fórmula:

$$\text{ISF\%} = \frac{\text{peso do fígado} \times 100}{\text{peso corpóreo}}$$

3.4.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.4.5.1. Homogenatos

Os homogenatos do fígado foram obtidos em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de NaCl (1:19 p/v). A homogeneização foi mantida a 4 °C, com cerca de 20 impactos em homogeneizador, seguida de centrifugação a 5000g durante 5 minutos. O sobrenadante foi mantido a – 20°C até sua utilização para análise das enzimas GST, CAT, GR, GPx, e do TBARS.

3.4.5.2. Extrato ácido

Após a dissecação de amostras do fígado, foram imediatamente precipitadas com ácido tricloroacético 12% (1:9 p/v) e homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador, seguidos de centrifugação a 5000g durante 5 minutos. Imediatamente após, foi feita a determinação da GSH no sobrenadante, o restante reservado e mantido a -20°C para a análise de GSSG e GT.

3.5. BIOMARCADORES DE DANO

3.5.1. Avaliação da lipoperoxidação tecidual (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, através da detecção em A₅₃₅ dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (Bird & Draper, 1984). Os homogenatos foram precipitados com ácido tricloroacético a 12% e agitados vigorosamente por 5 segundos.

Em seguida foram incubados em tampão Tris-HCL 60 mM 7,4; 0,1 mM DPTA e ácido tiobarbitúrico 0,73% durante 60 minutos a 100°C. Após este período, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C e centrifugado (5min a 10000g), e a absorbância da cor rósea, medida em 535nm, sendo os valores expressos em nmol g⁻¹.



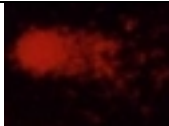
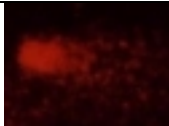
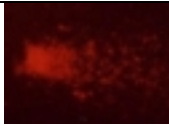
3.5.2. Avaliação de dano ao DNA (Teste Cometa)

A fragmentação do DNA foi avaliada através de eletroforese horizontal e microscopia de fluorescência utilizando o teste Cometa (Singh et al., 1988). As amostras de sangue foram coletadas com seringa heparinizada, 10 µl de sangue foram diluídos em 1 ml de PBS (Phosphate Buffered Salt). As células assim isoladas (10 µl) foram então embebidas em 75 µl de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA; 0,75 %) a 37°C. Esta mistura (células / LPMA) foi adicionada a uma lâmina para microscopia pré-coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (NMPA, 1 %). As lâminas foram mergulhadas em solução de lise gelada que continha 2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO e 10 mM Tris pH 10, por no mínimo 2 horas. Após este período, as lâminas foram incubadas por 25 minutos em tampão alcalino gelado (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13), e o DNA liberado foi submetido a uma eletroforese horizontal sob voltagem de 25V e uma corrente elétrica de 280 mA por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M (pH 7,5) e coradas com brometo de etídeo (2 µg/ml). A visualização foi feita em um microscópio de fluorescência com filtro de excitação de 515 a 560 nm.

Para controle negativo foi usado sangue de um peixe controle. Para controle positivo foi usado sangue de um peixe controle misturado com 100 µl de H₂O₂ (500 µM) e incubada por 10 minutos a 25°C. A análise de imagens foi feita segundo Collins (1995), onde, para cada animal, foram analisadas aleatoriamente imagens de 100 células (50 células de cada lâmina,

em duplicata) e o tamanho dos cometas (região nuclear + cauda) foi medido em unidades arbitrárias. Os cometas de cada animal foram classificados em classes, de acordo com o tamanho da cauda, variando de cometas sem cauda (com ausência de dano, classe 1), até cometas que apresentaram cauda longa (dano máximo, classe 5). A fim de expressar o dano visualizado nas lâminas em valores numéricos, cada classe recebeu uma pontuação, conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Pontuação e exemplos de cada classe de cometa visualizada.

	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Pontuação	0	1	2	3	4
Tipo de cometa.					

Para cada animal foi calculada uma pontuação de acordo com o número de cometas visualizados em cada classe, segundo a equação abaixo:

Índice de dano ao DNA = [(Nº de cometas classe 1 x 0) + (Nº de cometas classe 2 x 1) + (Nº de cometas classe 3 x 2) + (Nº de cometas classe 4 x 3) + (Nº de cometas classe 5 x 4)].

Conseqüentemente, obteve-se uma única pontuação para cada grupo estudado. Assim, o índice de dano de cada grupo podia variar de 0 (ausência de dano) a 400 (presença de dano máximo).

3.6. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.6.1. Avaliação dos antioxidantes enzimáticos

3.6.1.1. Catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima, foi utilizado o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm, durante 20 segundos, pela enzima presente na amostra. Utiliza-se a solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.6.1.2. Glutathione peroxidase (GPx)

Este ensaio baseia-se na medida do decréscimo de absorbância (340 nm), promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação de NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Para este ensaio, segundo Flohé & Gunzler (1984) utilizou-se 10 μl de amostra e 10 μl de ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 ml de um meio de reação composto de 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentaacético (DPTA) 5 mM pH 7,0, 15 ml de água destilada, 0,024 g de GR e 0,8 μl de GSH 5U colocada momentos antes do ensaio. Os ensaios foram feitos em duplicatas e os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.6.1.3. Glutationa redutase (GR)

O método utilizado para a análise da atividade desta enzima foi o proposto por Carlberg & Mannervick (1975), onde, durante 30 segundos, se verifica em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à redução da GSSG pela GR presente na amostra, em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de GSSG e DPTA 5mM. Os ensaios foram feitos em duplicatas e os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.6.1.4. Glutationa S-transferase (GST)

As GST constituem um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioésteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. A atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em 340 nm (Keen et al., 1974). A amostra era adicionada em um meio contendo 10 μl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 μl de GR 0,1 M de GSH e 970 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizava-se 980 μl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressas em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$.

3.6.2. Sistema tiól redox de antioxidantes

3.6.2.1. Glutationa reduzida (GSH)

Para avaliar a concentração de pequenos tióis nos hepatócitos dos animais em precipitado ácido (ácido tricloroacético 12%, 1:9, p:v), foi empregado o método de Beutler et al. (1963). A adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas

contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCL pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, promovia em até 3 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em A_{412} . O ensaio foi realizado em duplicatas e os valores expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$.

3.6.2.2. Glutathiona total (GT) e Glutathiona oxidada (GSSG)

Para esta análise foi utilizado o método enzimático de Tietze (1969), onde a taxa de oxidação do NADPH usada na redução da GSSG catalisada pela GR, permitia avaliar indiretamente a concentração da GT presente na amostra. As concentrações obtidas neste ensaio, bem como do ensaio citado acima, foram expressas em $\mu\text{mol g}^{-1}$. Os valores da GSSG foram calculados em equivalentes ($2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$), a partir da concentração da GT.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas através de análise de variância ANOVA, complementada por Tukey–Kramer, utilizando-se o software INSTAT (GrahPad, San Diego, CA, USA), admitindo níveis de significância mínimos de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS FÍSICO QUÍMICOS

A avaliação dos parâmetros físico-químicos das lagoas anaeróbia e de polimento está apresentada na tabela 7, onde foi observada uma diminuição da quantidade de sólidos totais, dissolvidos, suspensos, nitrogênio total e DQO referentes à lagoa anaeróbia, e lagoa de polimento comparativamente à lagoa anaeróbia. Pode-se dar destaque à grande quantidade de fósforo na lagoa de polimento; nesta lagoa também foi observada grande quantidade de nitratos e cloretos.

Tabela 7: Parâmetros físico-químicos dos efluentes de agroindústria de suínos.

Parâmetro físico-químico	Lagoa Anaeróbia	Lagoa de Polimento
Sólidos totais (mg/ℓ)	3630,0	2070,0
Sólidos dissolvidos (mg/ℓ)	2828,0	1878,0
Sólidos suspensos (mg/ℓ)	468,0	192,0
Sólidos suspensos voláteis (mg/ℓ)	NA	222,0
Fósforo total (mg/ℓ)	97,0	113,0
Nitrogênio total (mg/ℓ)	96,0	83,0
DQO (mg/ℓ)	3332,0	243,0
DBO (mg/ℓ)	NA	46,0
Nitratos (mg/ℓ)	NA	138,0
Alcalinidade total (mg CaCO₃/ℓ)	NA	350,0
Cloreto (mg/ℓ)	NA	1143,0
Turbidez UMT**	NA	116

- NA: resultado não avaliado.
- **unidade nefolométrica de turbidez.

4.2. TESTE DE TOXICIDADE

4.2.1. Microcrustáceo (*D. Magna*)

A figura 7 apresenta os resultados obtidos com os testes de toxicidade aguda referente às águas das lagoas anaeróbia e de polimento da planta de processamento da agroindústria, usando como bioindicador, o microcrustáceo *D. Magna*. Os resultados mostraram que a lagoa de polimento apresentou maior toxicidade, causando imobilidade nos organismos, e a CE_{50} nesta lagoa foi de 17%, enquanto na lagoa anaeróbia houve menor toxicidade, apresentando CE_{50} de 31%.

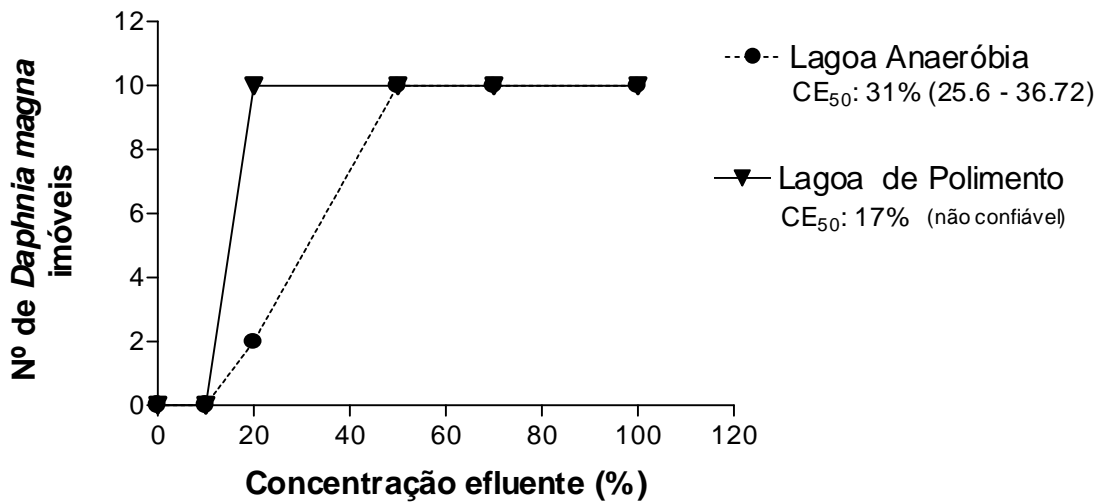


Figura 7. Teste de toxicidade aguda para o microcrustáceo *D. magna* após 48h de exposição em diferentes concentrações das águas das lagoas anaeróbia e de polimento da agroindústria de suínos. Os testes foram realizados em duplicata e os valores foram expressos como média \pm EPM, n =10.

4.2.2. Peixe Tilápia do Nilo

Os resultados obtidos com os ensaios de toxicidade aguda nas lagoas anaeróbia e de polimento da agroindústria de suínos realizados com a tilápia do Nilo estão apresentados na figura 8. Na lagoa anaeróbia a CL_{50} foi de 48,7%, já na lagoa de polimento a CL_{50} foi de 71,1% de toxicidade.

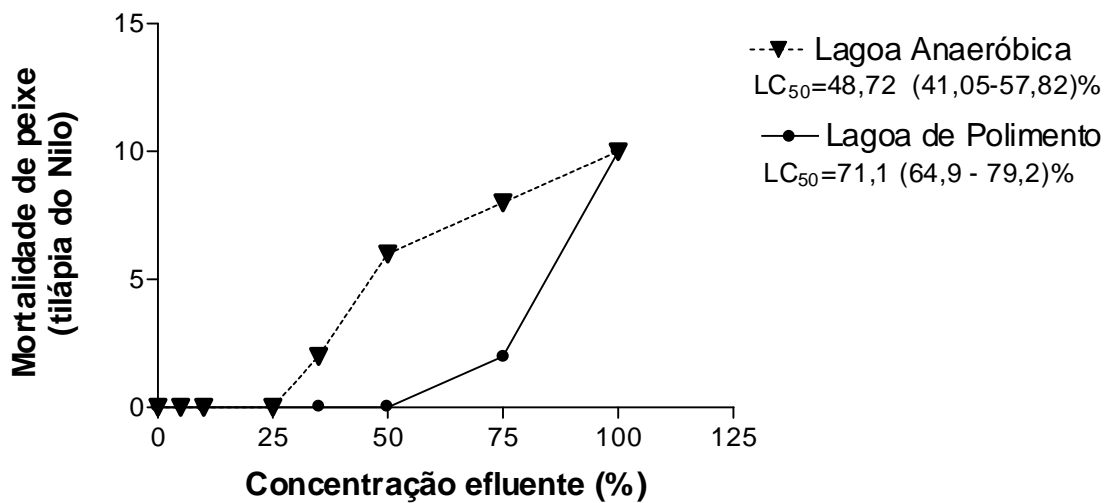


Figura 8. Teste de toxicidade aguda (7 dias) em tilápia do Nilo exposta a diferentes diluições das águas das lagoas anaeróbia e de polimento da agroindústria de suínos. Os testes foram realizados em duplicata e os valores foram expressos como média \pm EPM, $n = 10$.

4.3. AVALIAÇÃO DO ÍNDICE SOMÁTICO (ISF)

Foram avaliados os índices somáticos dos fígados dos peixes expostos aos efluentes lagoa anaeróbia e lagoa de polimento durante 7, 15, 30, 60 e 90 dias de exposição e controles. Na figura 9 pode-se observar uma diminuição significativa do índice somático dos fígados dos peixes expostos por 7, 30, 60 dias na lagoa anaeróbia em relação ao grupo controle. Na lagoa de polimento foi observada uma diminuição significativa com 15 e 30 dias de exposição em relação aos controles.

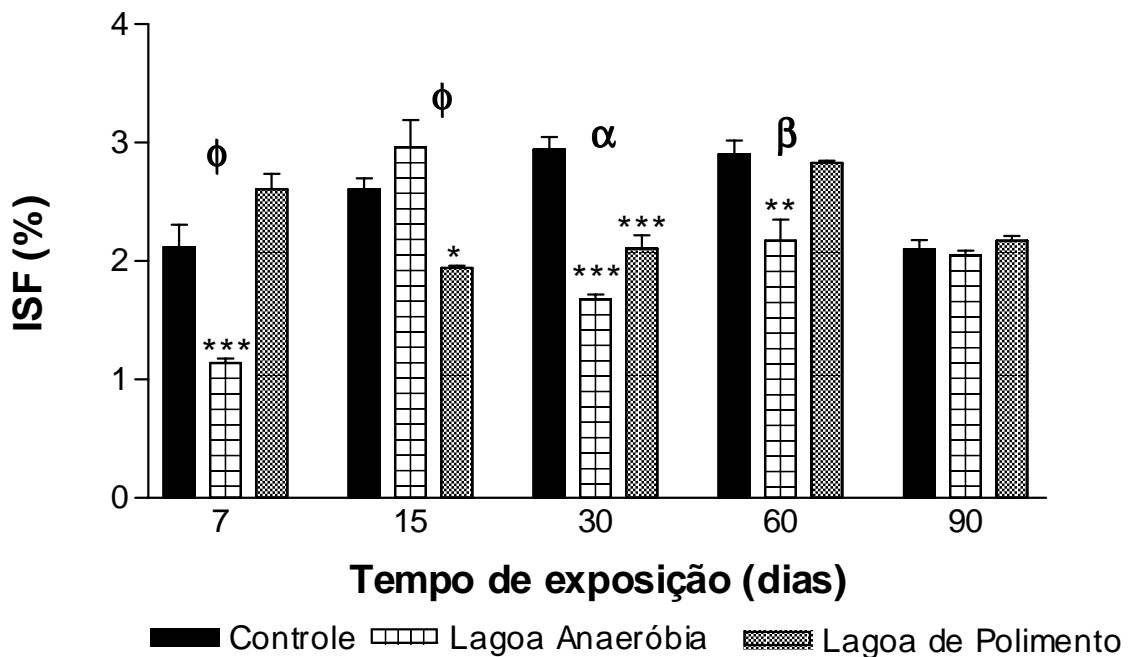


Figura 9: Índice somático de fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento (n=6 cada) de agroindústria de suínos e controles; valores apresentados (média ± EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), entre lagoas (α <0,05; β <0,01; ϕ <0,001).

4.4. ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DE DANO

4.4.1. Análise de lipoperoxidação (TBARS)

Os níveis de lipoperoxidação (Figura 10), avaliados através da concentração de TBARS, em tilápias expostas às lagoa anaeróbia e de polimento, aumentaram significativamente após 7 e 15 dias de exposição em relação ao grupo controle, normalizando em 30 dias, e voltando a elevar-se progressivamente em 60 e 90 dias de exposição.

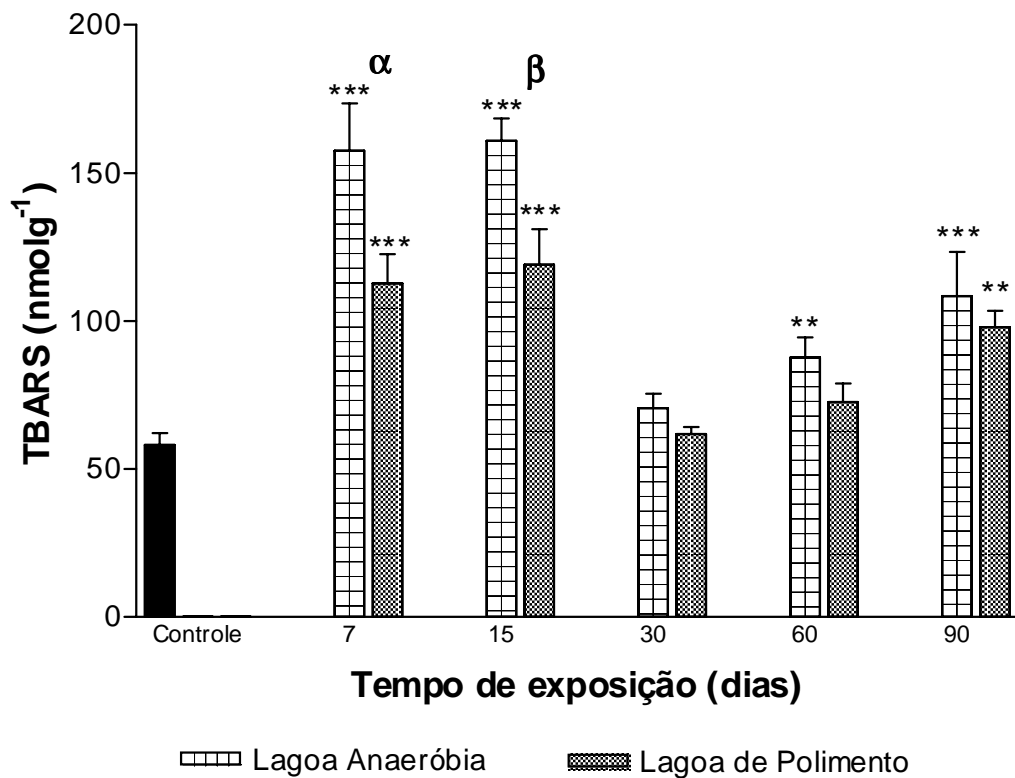


Figura 10: Índice de peroxidação lipídica (TBARS; nmol g⁻¹) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento (n=6) de agroindústria de suínos e grupo controle (n=13); valores apresentados (média ± EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (**p<0,01; ***p<0,001), entre as lagoas (α <0,05; β <0,01).

4.4.2. Avaliação de genotoxicidade (Teste Cometa)

A percentagem da distribuição dos cometas por classe estão apresentados na (Tabela 8). O grupo controle apresentou maior percentagem de células nas classes 1 e 2 com 54 e 35%, respectivamente, durante todo o tempo de exposição. No grupo da lagoa anaeróbia foi observada maior percentagem de cometas, de acordo com o tempo de exposição: classe 4: 38%, 7 dias; classe 3: 43%, 15 dias; classe 3: 58%; 30 dias; classe 3: 51%, 60 dias; classe 1 e 2: 39 e 36% respectivamente, após 90 dias de exposição. Na lagoa de polimento os maiores valores de percentagem de cometa, de acordo com o tempo de exposição: classe 4: 36%, 7 dias; classe 3: 45%, 15 dias; classe 2: 55%, 30 dias; classes 2 e 3: 43 e 39%, respectivamente, para 60 e 90 dias de exposição.

Tabela 8: Percentagem de células com e sem cometas distribuída por classes, de acordo com o tamanho da cauda.

Tipo de exposição	classe 1	Classe 2	Classe 3	classe 4	classe 5
Controle (n = 8)	54%	35%	11%	1%	0%
Anaeróbia 7 dias	3%	28%	19%	38%	11%
Anaeróbia 15 dias	9%	17%	43%	30%	1%
Anaeróbia 30 dias	2%	17%	58%	21%	2%
Anaeróbia 60 dias	10%	27%	51%	13%	0%
Anaeróbia 90 dias	39%	36%	24%	2%	0%
Polimento 7 dias	12%	20%	23%	36%	10%
Polimento 15 dias	1%	21%	45%	33%	1%
Polimento 30 dias	11%	55%	29%	5%	0%
Polimento 60 dias	13%	43%	39%	6%	0%
Polimento 90 dias	14%	43%	39%	4%	0%

O teste Cometa demonstrou aumentos significativos de cometas, nas lagoas anaeróbia e de polimento, desde a primeira semana de exposição. Este número de cometas diminuiu com o tempo de exposição até não haver diferença significativa na lagoa anaeróbia após 90 dias de exposição, enquanto que lagoa de polimento manteve-se estável de 30 a 90 dias de exposição, mas ainda significativamente aumentados em relação ao controles, (Figura 11).

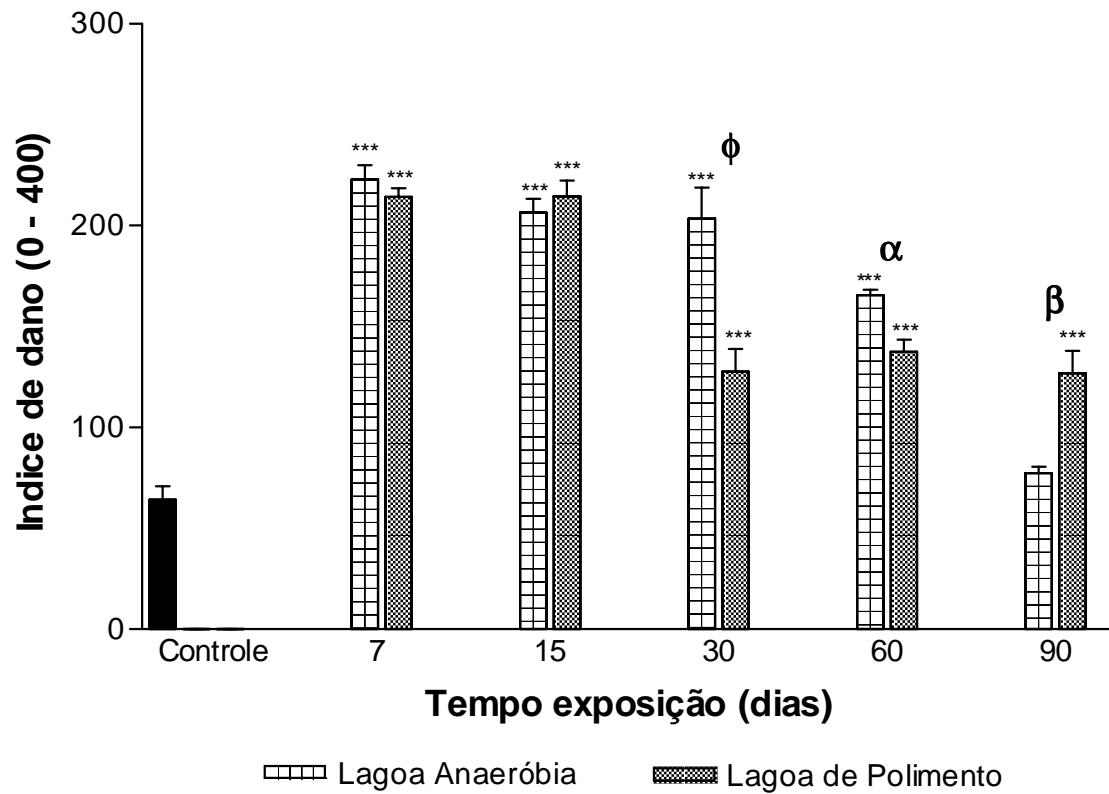


Figura 11: Dano ao DNA em eritrócitos presentes em sangue total de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento (n=5) de agroindústria de suínos e grupo controle (n=13); valores apresentados (média \pm EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (***) $p < 0,001$), entre as lagoas ($\alpha < 0,05$; $\beta < 0,01$; $\phi < 0,001$).

4.4.3. GLUTATIONA OXIDADA (GSSG)

Os níveis de GSSG (Figura 12), na lagoa anaeróbia mostraram um aumento significativo com 60 e 90 dias de exposição em relação ao controle. Na lagoa de polimento foram observados aumentos significativos durante todo o período de exposição, tendo uma diminuição com 30 dias mais mantendo-se elevado em relação ao controle.

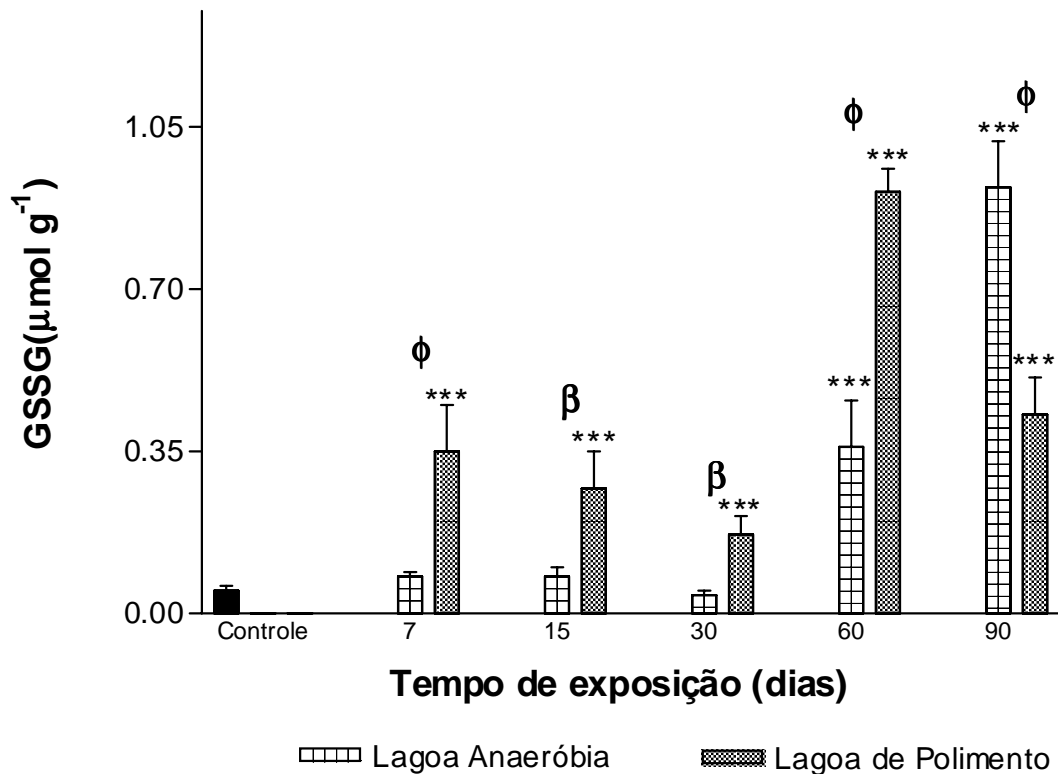


Figura 12: Níveis de GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}$) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento ($n=6$) de agroindústria de suínos e grupo controle ($n=13$); valores apresentados (média \pm EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles ($***p<0,001$), entre as lagoas ($\beta<0,01$; $\phi<0,001$).

4.5. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1. CATALASE

A atividade da CAT (Figura 13), nos fígados de tilápias expostas à águas da lagoa anaeróbia mostrou aumentos significativos com 7, 30 e 60 dias de exposição em relação aos controles. Na lagoa de polimento observou-se aumentos significativos durante todo o período experimental, exceção aos 15 dias de exposição em relação ao controle.

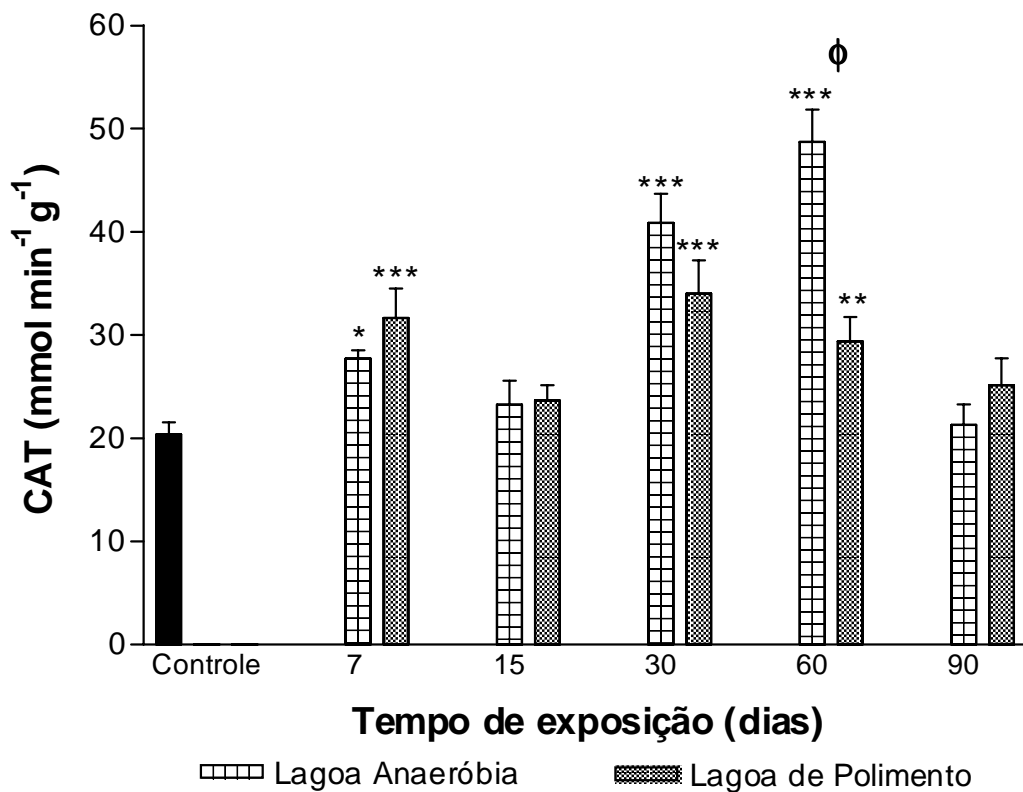


Figura 13: Atividade da catalase (mmol g⁻¹ min⁻¹) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento (n=6) de agroindústria de suínos e grupo controle (n=13); valores apresentados (média ± EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), entre as lagoas (φ<0,001).

4.5.2. GLUTATIONA PEROXIDASE

Atividade da GPx (Figura 14), no fígado de peixes expostos à lagoa anaeróbia mostrou aumento significativo apenas com 60 dias de exposição comparada aos controles. Na lagoa de polimento foi observado um perfil semelhante, com aumentos significativos aos 7, 30 e 60 dias de exposição. Nos demais períodos de exposição não foram observados alterações significativas na atividade da GPx nos animais expostos em relação ao grupo controle.

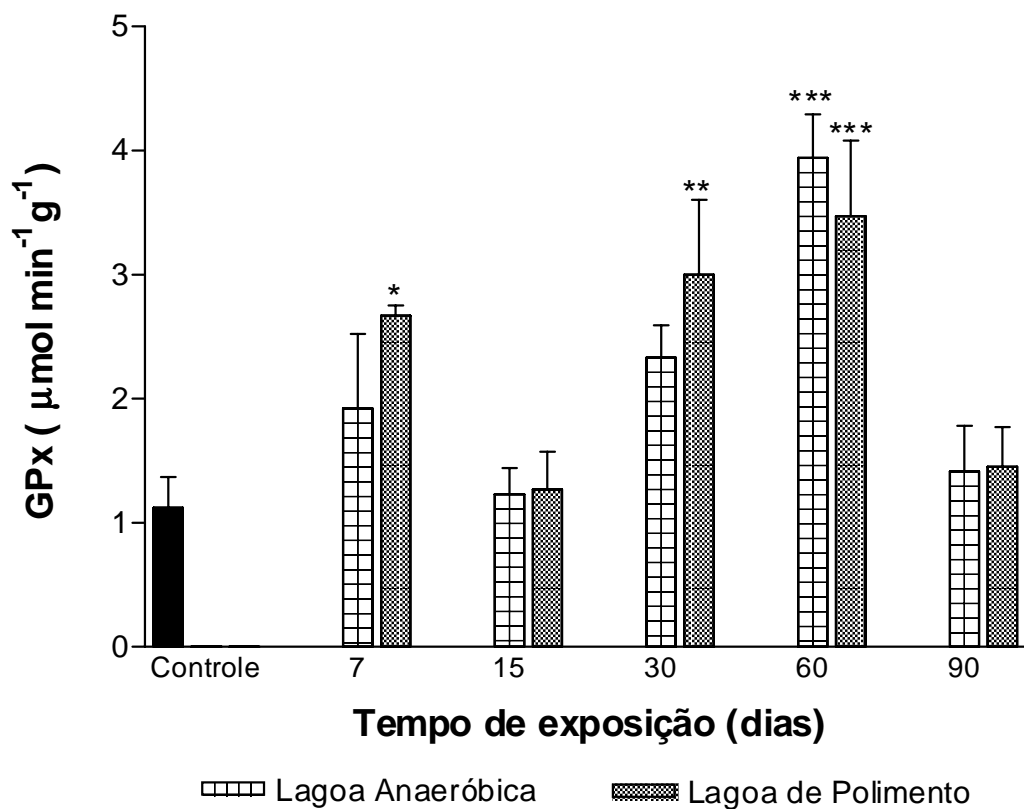


Figura 14: Atividade da GPx ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{min}^{-1}$) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento ($n=6$) de agroindústria de suínos e grupo controle ($n=13$); valores apresentados (média \pm EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.5.3. GLUTATIONE REDUTASE

A atividade da GR (Figura 15), em fígado de tilápia do Nilo exposta à lagoa anaeróbia apresentou aumento significativo com 7 dias de exposição em relação aos controles, diminuindo em até 90 dias, sugerindo uma inibição desta enzima. Na lagoa de polimento, observando-se aumento significativo com 90 dias de exposição.

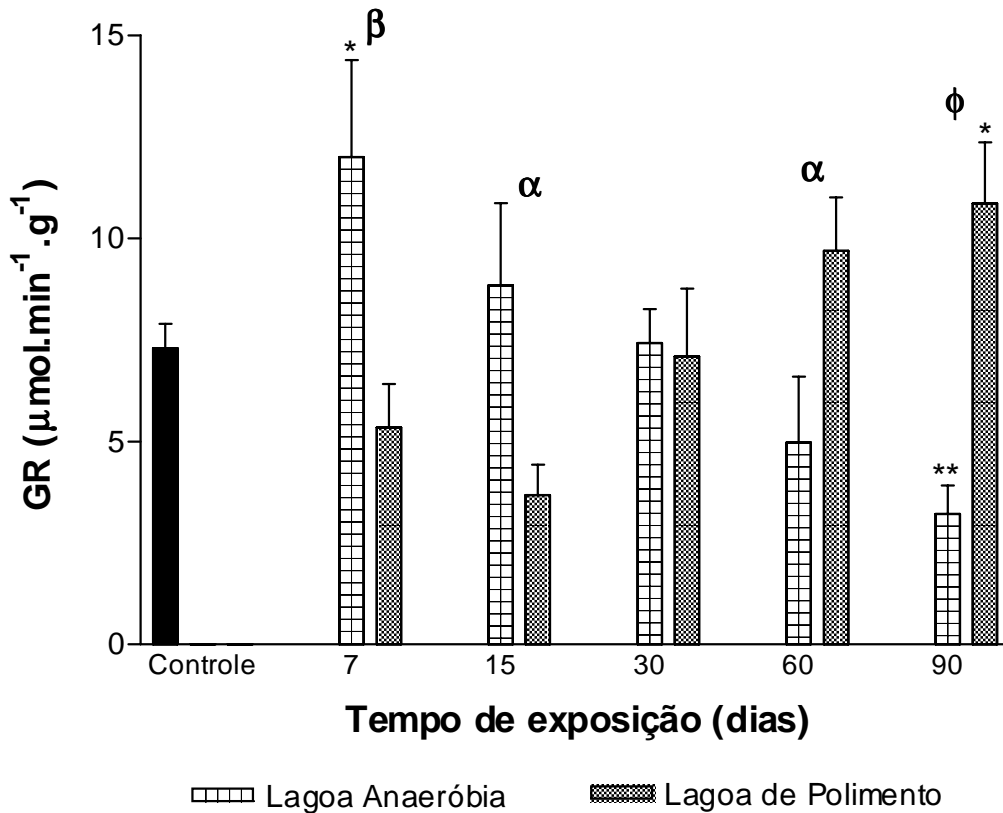


Figura 15: Atividade da GR ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{min}^{-1}$) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento ($n=6$) de agroindústria de suínos e grupo controle ($n=13$); valores apresentados (média \pm EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (* $p<0,05$; ** $p<0,01$), entre as lagoas ($\alpha<0,05$; $\beta<0,01$; $\phi<0,001$).

4.5.4. GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade de GST (Figura 16), em exposição à lagoa anaeróbia aumentou significativamente durante os 90 dias de exposição em relação ao grupo controle. Na lagoa de polimento sua atividade apresentou-se aumentada significativamente com 7 dias, normalizando durante os outros períodos, e com novo aumento da atividade da GST em 60 e 90 dias de exposição.

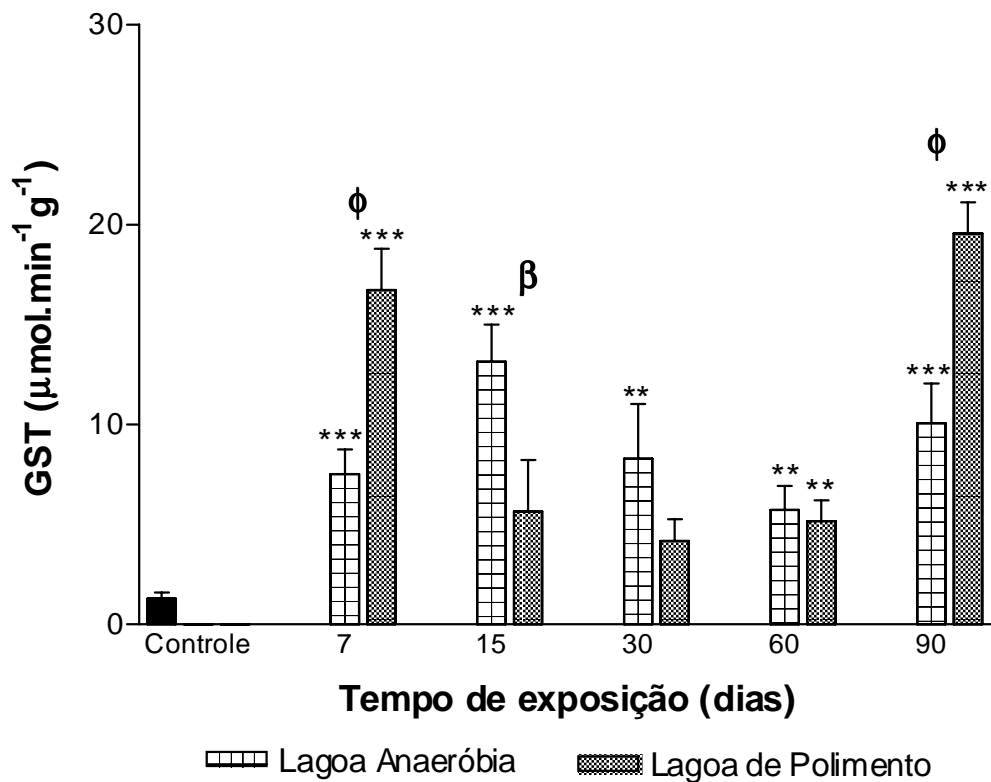


Figura 16: Atividade da GST ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento ($n=6$) de agroindústria de suínos e grupo controle ($n=13$); valores apresentados (média \pm EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (** $p<0,01$; *** $p<0,001$), entre as lagoas ($\beta<0,01$; $\phi<0,001$).

4.6. DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICA

4.6.1. GLUTATIONA REDUZIDA

Os níveis de glutathiona reduzida (Figura 24) em fígado de tilápia do Nilo exposta à lagoa anaeróbica não se alterou significativamente durante os 90 dias de exposição em relação aos controles. Já na lagoa de polimento os níveis de GSH no fígado mantiveram-se acima dos níveis apresentados pelos controles somente com 90 dias de exposição.

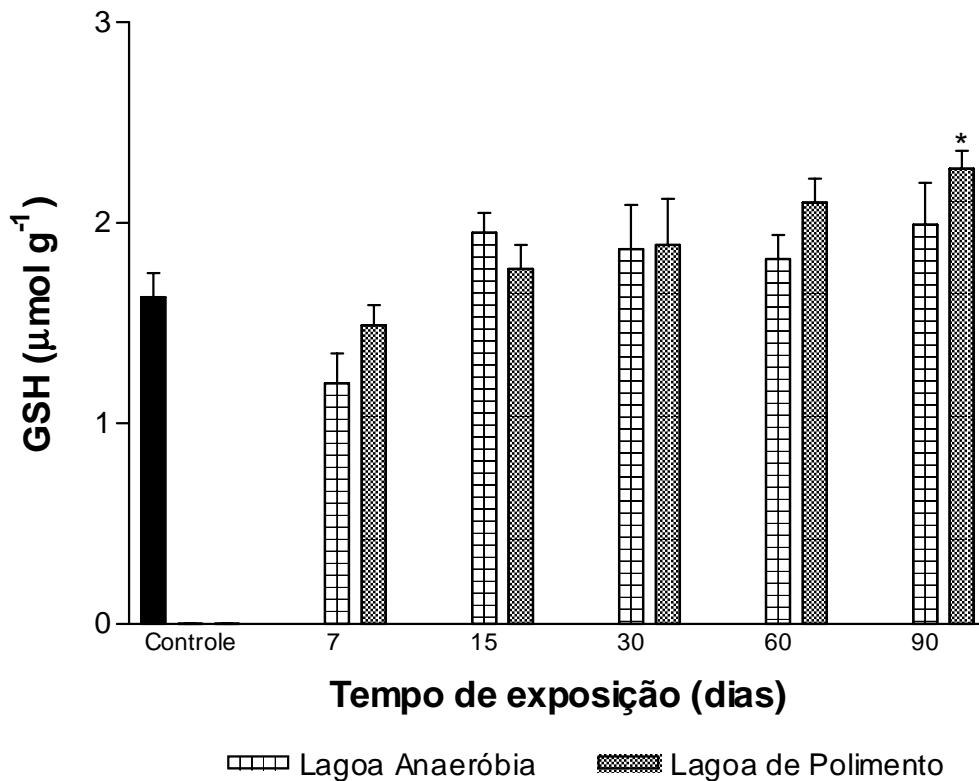


Figura 17: Nível da GSH ($\mu\text{mol g}^{-1}$) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbica e de polimento ($n=6$) de agroindústria de suínos e grupo controle ($n=13$); valores apresentados (média \pm EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (* $p<0,05$).

4.6.2. GLUTATIONA TOTAL

Os níveis de GT (Figura 18) na lagoa anaeróbia revelaram um aumento significativo com 90 dias de exposição em relação aos controles. Na lagoa de polimento, de forma análoga, foram observadas, com 30, 60 e 90 dias, aumentos significativos em relação aos controles, nas demais exposições não foram observadas diferenças entre os animais expostos e o grupo controle.

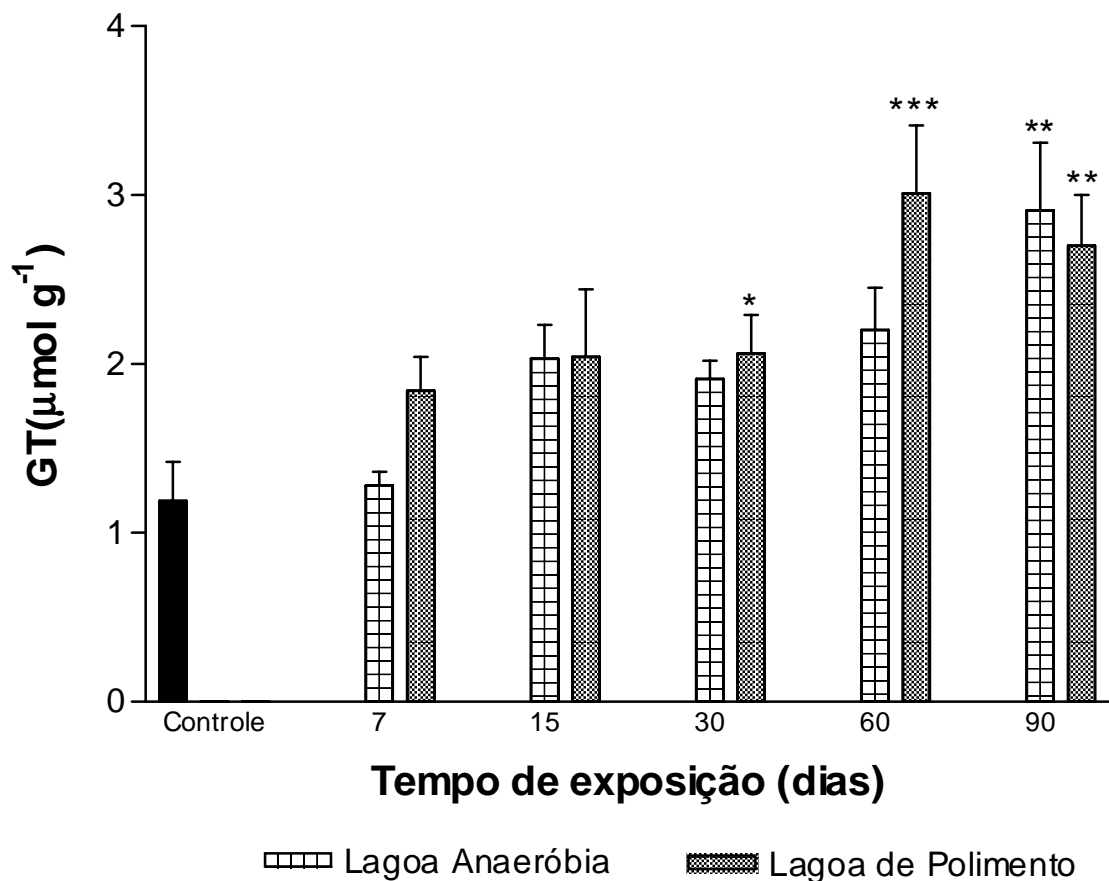


Figura 18: Nível de GT ($\mu\text{mol g}^{-1}$) em fígado de tilápia do Nilo expostas às águas da lagoa anaeróbia e de polimento (n=6) de agroindústria de suínos e grupo controle (n=13); valores apresentados (média \pm EPM). Diferenças significativas das lagoas em relação aos controles (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5. DISCUSSÃO

Os efluentes da suinocultura contém uma alta concentração de contaminantes incluindo sólidos suspensos, compostos orgânicos, e nutrientes, e podem deteriorar a qualidade dos ambientes aquáticos onde ele é descarregado (Stone et al., 1998). Pelos resultados obtidos quanto à composição química das lagoas, foi observada uma diminuição de vários componentes orgânicos presentes na lagoa anaeróbia, como sólidos totais, dissolvidos, suspensos, e nitrogênio total para a lagoa polimento, demonstrando uma relativa eficiência no tratamento destes efluentes. Por outro lado, a quantidade de outros componentes, como fósforo total, aumentou ao longo do processo de tratamento. Adicionalmente, foram evidenciados altos níveis de nitratos, cloretos, nitrogênio total e sólidos suspensos na lagoa de polimento, podendo indicar tanto um processo de concentração gradativa, como uma relativa ineficiência do tratamento para estes componentes. Altos níveis de fósforo e nitrogênio na água podem levar à chamada eutrofização (Thomann e Mueller, 1987). Segundo o CONAMA (1986), órgão que estabelece limites para a presença de poluentes em efluentes industriais, podem ser emitidos efluentes nos corpos hídricos se os mesmos apresentarem concentrações limitadas para os seguintes parâmetros: sólidos dissolvidos totais, cloreto total, fósforo total, nitrato e nitrito, nitrogênio total, entre outros. Pode ser observada na lagoa de polimento uma quantidade acima da permitida pelo CONAMA quanto aos sólidos dissolvidos totais, sendo 3,8 vezes maior que a estabelecida na resolução de 1986, assim como as substâncias químicas inorgânicas, como cloreto total (4,6 vezes), fósforo total (11,4 vezes), nitrato (13,9 vezes), nitrogênio total (4,2 vezes), mostrando que a quantidade destes componentes liberados no ambiente está muito acima do que os limites permitidos.

A *D. magna* é um organismo muito usado em ensaios biológicos para determinar a qualidade da água de efluentes (Peltier e Weber, 1985). Este ensaio biológico, que caracteriza toxicidade aguda de compostos ou mistura deles, é muito aceito em vários países para análise toxicológica da água, principalmente de efluentes industriais. Os ensaios de CE₅₀ avaliam a mobilidade do organismo frente a toxicidade do efluente, durante determinado tempo de exposição. Este teste que foi realizado com águas das lagoas anaeróbia e de polimento, revelou uma maior toxicidade na lagoa de polimento que consiste no efluente de fase final de tratamento, na qual observou-se uma CE₅₀ de 17,3%, enquanto na lagoa anaeróbia observou-se uma CE₅₀ de 30,7%. Segundo Aguayo et al. (2004), valores de CE₅₀ menores que 20% para efluentes são considerados como muito tóxicos. O aumento de toxicidade na lagoa de polimento para *D. magna* poderia ser devido à grande quantidade de compostos tóxicos presente nesta lagoa, como cloretos, nitratos, e fósforo, aspecto que já foi demonstrado também em outros trabalhos congêneres (Navarro, 1999). É importante ressaltar, que os microcrustáceos são particularmente sensíveis a alterações nas concentrações de íons no meio aquático, que podem levar a alterações na permeabilidade da membrana, acarretando uma rápida mortalidade, ou imobilidade do organismo. Desta forma, a maior toxicidade na lagoa de polimento para *Daphnia magna* poderia ser consequência dos altos níveis de fósforo e cloreto presentes.

Os testes de CL₅₀ avaliam a concentração de efluente que causa a mortalidade de 50% dos indivíduos expostos. Os testes realizados com tilápias do Nilo, revelaram que a toxicidade aguda da lagoa anaeróbia foi maior que a de polimento. Na lagoa anaeróbia para tilápia obteve-se CL₅₀ de 48,7%, e na lagoa de polimento tilápia CL₅₀ de 71,7%. Estes resultados sugerem, contrariamente aos obtidos na *D. magna*, uma maior toxicidade para peixes presente na lagoa anaeróbia, sugerindo uma toxicidade diferenciada para os dois organismos indicadores, associada a uma composição diversificada de contaminantes nas duas lagoas e

características fisiológicas dos organismos utilizados. Na lagoa anaeróbia persiste uma elevada concentração de matéria orgânica em forma de sólidos (Tabela 7), diminuindo a disponibilidade de oxigênio, comprovada pela elevada DQO, tornando o ambiente aquático inadequado para sobrevivência dos peixes.

A análise do índice somático do fígado tem sido relatado em várias investigações de estresse (Barnes et al., 1984; Willemse et al., 1984; Adams et al., 1985). A exposição de animais a determinados contaminantes pode levar a uma diminuição no ISF, sendo isto um reflexo da mudança de alimentação, ou uma resposta comportamental para certos estressores (Brown et al., 1987; Ricard et al., 1998). O fator condicional para a diminuição do ISF pode ser atribuído ao aumento da taxa metabólica em resposta fatores estressores (Schreck, 1990). Os resultados obtidos na lagoa anaeróbia mostraram uma diminuição significativa no peso do fígado com 7 dias de exposição possivelmente refletindo, uma resposta do estresse sofrido pelo animal, após uma aparente recuperação com 15 dias, o índice somático do fígado diminuiu novamente com 30 dias, sugerindo assim, um ciclo bifásico de resposta dos animais face ao estresse de exposição às lagoas. Resultados semelhantes foram observados nos biomarcadores de dano e de estresse oxidativo onde igualmente revelou-se um perfil bifásico. Na lagoa de polimento, o ISF diminuiu com 15 e 30 dias de exposição, provavelmente em consequência do estresse sofrido pelo animal frente aos vários contaminantes presentes na água.

O MDA (malondealdeído) é o principal produto liberado pela oxidação de membranas, sendo um importante indicador de lipoperoxidação, geralmente avaliada em termos de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), (Freeman e Crapo, 1981). O fígado normalmente contém elevados conteúdos de lipídeos em suas células, sendo, por consequência, muito susceptível à lipoperoxidação (Huang et al., 2003). O aumento dos níveis de lipoperoxidação durante as 2 primeiras semanas (exposição sub-crônica), sugere que

durante este período as tilápias, aparentemente, estavam expostas a agentes estressores e ainda não possuíam uma compensação de defesas antioxidantes suficiente para neutralizar completamente a lipoperoxidação. Após este período inicial, aos 30 dias de exposição, evidenciou-se uma diminuição destes níveis, próximos aos exibidos pelos controles, principalmente na lagoa de polimento. Mediante períodos mais longos de exposição (exposição crônica), após 60 e 90 dias, os níveis de LPO nas tilápias expostas a ambos efluentes voltaram a crescer. Aparentemente, repetiu-se o comportamento bifásico das tilápias face à exposição a ambas lagoas de tratamento: após à primeira fase, caracterizada por um período que se estende até cerca de um mês de exposição, onde o processo de lipoperoxidação primeiro aumentou, para posteriormente atingir níveis próximos dos controles, ocorre uma segunda fase, que coincide com novo aumento do dano oxidativo, o qual se estende até o final do período experimental. A partir desta segunda fase, novamente os peixes parecem não atingir uma compensação antioxidante adequada, provavelmente iniciando um processo irreversível de perda de uma resposta persistente àquela exposição mais prolongada. Respostas semelhantes foram obtidas em tilápias expostas sub-cronicamente e cronicamente a diferentes tipos de efluentes da indústria de papel e celulose (Wilhelm Filho et al., 1997; Pedrosa et al., 1997) e da indústria de tecelagem (Ribeiro et al., 2000), sugerindo que, independentemente da natureza química dos efluentes, esta espécie de peixe possui respostas do seu sistema de defesas antioxidantes muito similares entre si, e que provavelmente seriam caracterizadas por duas fases distintas.

O teste Cometa é considerado de grande aplicabilidade em laboratórios de estudo de contaminação ambiental, sendo uma técnica sensível e de baixo custo (Nacci et al., 1996). Vários trabalhos relatam sua aplicabilidade e eficiência na detecção da quebra da fita de DNA, tanto para peixes quanto para bivalves expostos a contaminantes (Belpaeme, 1996; Pandrangi, 1995; Ralph, 1996). Os resultados obtidos em nosso trabalho mostraram um

aumento da fragmentação do DNA nos peixes expostos às duas lagoas. Foi observado um aumento no número de cometas nos tratamentos desde os sete dias de exposição, o qual diminuiu com o tempo de exposição, e quase normalizando com 90 dias de exposição nas duas lagoas. Neste sentido, o dano ao DNA exibiu um perfil distinto da lipoperoxidação nos peixes expostos as duas lagoas, onde foi observado um perfil bifásico, conforme comentado anteriormente. Esta diferença na resposta tecidual possivelmente deve-se ao fato de que as enzimas de reparo nos eritrócitos teriam uma velocidade e eficiência de restauração menor que as do fígado. Além disto, é importante notar que o dano ao DNA provocado possivelmente por ataque de radicais livres e compostos genotóxicos presentes nas águas avaliadas, são revertidos por mecanismos outros que aqueles das defesas antioxidantes, e portanto, sua normalização, não necessariamente, teria a mesma velocidade de recuperação. Resultados semelhantes foram obtidos por Nacci (1996), utilizando peixes e moluscos expostos a sedimentos contaminados com PHA, durante um período de 28 dias. Da mesma forma, estudos semelhantes realizados em tilápias expostas a efluentes de carvão mineral (Benassi, 2003), apresentaram resultados convergentes com os do presente trabalho. O ensaio do teste Cometa indiretamente revela a ação de substâncias com atividade genotóxica, avaliando o dano ao DNA, o qual é identificado em células individuais após uma exposição aguda, sub-crônica ou crônica do organismo ao efluente (Pandrangri, 1998). Já foram encontrados na literatura vários trabalhos com diversas espécies de animais e vegetais (Betti e Nigro, 1996; Silva et al., 1999; Nigro, 2002; Huang et al., 2002; Maria, 2003), demonstrando que o teste Cometa é um teste sensível para estudos de genotoxicidade ambiental. Diferentemente da lipoperoxidação a fragmentação do DNA causada pela exposição de tilápias, tanto à lagoa de polimento, quanto à anaeróbia, em geral apresentaram perfis de dano e reparo muito semelhantes, tanto no que diz respeito à distribuição do dano por classe (Tabela 9), quanto por índice de dano (Figura 11), o que supõe uma provável contribuição

quantitativa semelhante quanto aos agentes genotóxicos diretos e/ou à geração de EROs/ERNs existentes nas duas lagoas.

Biomarcadores são geralmente aceitos como ferramentas úteis em programas de diagnóstico e monitoramento ambiental, para uma avaliação qualitativa e quantitativa do impacto causado por contaminantes e atividades antropogênicas em organismos aquáticos (Regoli et al., 1998). Estes biomarcadores são úteis indicadores de exposição aos poluentes, revelando diversos efeitos de exposição pelos organismos, tendo assim, grande relevância ecológica (Depledge, 1994). A exposição da tilápia as lagoas de agroindústria de suínos por 7, 15, 30, 60 e 90 dias, resultou tanto na elevação como na redução no fígado de diferentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, ou seja, os marcadores de estresse oxidativo.

A atividade da catalase mostrou um perfil muito semelhante à da glutathione peroxidase ao longo do período experimental fato já esperado, uma vez que, metabolicamente elas exercem a mesma função. Após uma indução durante a primeira semana, na segunda semana as atividades das duas enzimas foram próximas às dos controles, voltando a aumentar durante o 30 e 60 dias de exposição, até se equipararem aos controles com 90 dias de exposição. Estas duas enzimas possuem capacidades semelhantes em termos de metabolizar hidroperóxidos: enquanto a catalase catalisa a transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Halliwell & Gutteridge, 1999; Fridovich, 1999), a glutathione peroxidase pode, além de metabolizar o peróxido de hidrogênio, catalisar a redução de outros hidroperóxidos usando glutathione como substrato, além de reduzir outros peróxidos presentes nas membranas ou álcoois (Epp et al., 1983). Também é importante ressaltar a diferente distribuição intracelular das duas enzimas, enquanto a catalase tem localização predominantemente intraorganela, particularmente nos peroxissomas e mitocôndrias, a GPx encontra-se largamente distribuída no citosol e membrana plasmática. Nossos resultados indicaram uma relevante e conjunta capacidade para detoxificação de peróxidos orgânicos das duas enzimas,

reforçando o paralelismo funcional de ambas enzimas, aspecto já evidenciado anteriormente, tanto em vertebrados quanto invertebrados (Wilhelm Filho et al., 1996; 2000; 2001). O aumento da atividade da GPx no fígado de peixes expostos as lagoas da agroindústria de suínos sugere a eficiência deste órgão na neutralização do impacto causado por peróxidos, resultando na concomitante diminuição da lipoperoxidação, pelo menos até o final do primeiro mês de exposição em ambas lagoas. Este efeito protetor da GPx contra a lipoperoxidação já fora observado em outros trabalhos envolvendo organismos aquáticos (Winston e Di Giulio, 1991). Uma característica importante destas enzimas, é sua indução em condições de elevado estresse oxidativo, constituindo uma importante adaptação ao estresse induzido por contaminantes (Zhang et al., 2004). Por outro lado, a elevação da atividade destas duas enzimas durante a exposição às duas lagoas de tratamento sugerem, tanto uma grande geração de peróxido de hidrogênio, quanto indiretamente, uma maior formação de ânion superóxido, uma vez que grande parte dos eventos moleculares associados à acumulação destes hidroperóxidos, deve-se originalmente, a uma geração de ânion superóxido, pela primeira redução do oxigênio molecular que rapidamente pode dismutar este ânion em H_2O_2 e O_2 , via ação da SOD. Infelizmente, por motivos de ordem técnica no presente trabalho, não foi possível fazer uma avaliação da atividade da SOD, o que poderia elucidar em grande parte a origem dos hidroperóxidos presente no meio celular avaliado.

A glutationa redutase mostrou uma clara diferença no perfil de atividade enzimática no fígado de tilápias expostas as lagoa anaeróbia e de polimento. Na lagoa anaeróbia, após uma indução inicial até 15 dias de exposição, apresentou-se com tendência à inibição, e significativamente inibida em 90 dias de exposição. Esta inibição sugere a presença de compostos presentes na lagoa que afetariam a atividade metabólica desta enzima, conforme já observado com fármacos (Pedrosa et al., 2001), ou pela formação de peroxidonitrito, formado a partir da alta quantidade de nitratos, o qual apresenta capacidade de modificar a função da

GR, fato observado por Francescuti et al. (1996), como também pela alteração na disponibilidade de NADPH formada a partir da glicose-6-fosfato desidrogenase oriunda da via das pentoses, afetando os níveis de GSH proveniente da regeneração da GSSG, o cofator redutor da GR (Zhang et al., 2004). A taxa de glutathiona redutase é para a manutenção da concentração citosólica de glutathiona reduzida; a indução da atividade da GR é um potencial biomarcador de estresse oxidativo (Stegeman et al., 1992). Ao contrário da lagoa anaeróbia, a atividade da glutathiona redutase em tilápias expostas à lagoa de polimento com sete dias estava inibida e aumentou gradativamente ao longo do período de exposição, principalmente com 90 dias de exposição. De modo coerente, os conteúdos de GSH no fígado de tilápia exposta à lagoa de polimento foram significativamente maiores quando comparados às tilápias controles neste período, demonstrando uma resposta compensatória quanto à tentativa de manutenção dos níveis elevados de GSH naqueles peixes, no sentido de manter um elevado poder redutor celular face ao insulto oxidativo persistente.

A GSH é um cofator redutor necessário para atividade da GPx e GST, sendo um efetivo neutralizador de espécies reativas de oxigênio (Ross, 1988), constituindo uma primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (Uhlig e Wendel, 1992). Desta forma, os níveis de GSH não se alteraram durante o período experimental, apenas com 90 dias foi observado um aumento significativo deste tiol após exposição das tilápias à lagoa de polimento. Este aumento poderia ser devido ao aumento da GR, que realiza a manutenção da GSH, além do aumento de GT e GSSG, neste período, devido ao aumento da requisição de GSH pela GST para a detoxificação de xenobióticos, além de indicar o papel adaptativo e de proteção da GSH contra o estresse oxidativo provocado por contaminantes ambientais. Esta resposta frente ao estresse demonstrado pela GSH foi igualmente observada em outros trabalhos realizados com peixes expostos a diferentes tipos de contaminantes (DiGiulio,1993;

Rodriguez-Ariza et al., 1993ab; Hasspieler et al., 1994, Wilhelm Filho et al., 1997; Pandley et al., 2003; Fátima et al., 2000) .

A detoxificação das EROs implica na oxidação da GSH pela GPx ou por neutralização direta, sendo a GSSG reduzida para GSH pela GR que necessita de NADPH, o qual é produzido na via das pentoses (Kirlin, 1999). Desta forma, o aumento dos níveis de glutathiona oxidada foi similar ao aumento nos níveis de GSH, o qual apresentou maior aumento em exposição à lagoa de polimento, e os aumentos da GT poderiam ser consequência da síntese *de novo*. Resultados semelhantes foram observados em mexilhões e rãs expostas às águas de planta de processamento de efluentes de esgoto (Ciccotelli, 1998).

Segundo Stein et al. (1993), os níveis de glutathiona total têm sido considerados como um bom índice de exposição a contaminantes. O aumento significativo dos níveis de glutathiona total durante todo o período de exposição aos efluentes das lagoas anaeróbia e de polimento, corroboram esta afirmação, constituindo outra resposta ao estresse causado pelos contaminantes presentes nestas lagoas. Os níveis da glutathiona total, glutathiona oxidada, a atividade glutathiona S-transferase, assim como os níveis de lipoperoxidação, e o índice somático do fígado, mostraram um comportamento bifásico ao longo do período de exposição. Com cerca de 30 dias apresentaram uma aparente compensação antioxidante relativamente aos contaminantes, e, após um maior tempo de exposição, com 60 e 90 dias, voltaram a aumentar, aparentemente sem neutralizar completamente o dano causado pelas EROs/ERNs.

A atividade da glutathiona S-transferase pode ser postulada como um biomarcador de contaminantes ambientais em diferentes espécies animais (Bend e James, 1978; Almar et al., 1988; Ahmad et al., 2000, Wilhelm Filho et al., 2001). A GST é uma enzima multicomponente envolvida na detoxificação de muito xenobióticos, além de representar um importante papel na proteção de tecidos contra o estresse oxidativo (Fournier et al., 1992). Ela

é uma enzima da fase II de biotransformação, e apresenta a propriedade de conjugar xenobióticos e depois excretar os mesmos. Nas duas lagoas de tratamento, a atividade da GST esteve aumentada significativamente durante todo o período experimental em relação aos controles. Entretanto, apesar de sempre elevado, o perfil da atividade da GST apresentou dois picos de maior atividade para a lagoa de polimento, um por volta de 7 dias e outro com 90 dias, sugerindo novamente, uma resposta bifásica. Considerando que a GST tem um duplo papel, um através da neutralização de EROs e ERNs, e outro na biotransformação de xenobióticos, poderia ser especulado que a elevação da sua atividade a curto prazo, provavelmente, representaria uma resposta de defesa frente ao estresse oxidativo, gerado pela exposição a lagoa de polimento. Já a longo prazo, significaria principalmente, uma resposta vinculada à biotransformação de xenobióticos. As diferentes respostas obtidas pela GST através da exposição de tilápias às duas lagoas poderia ser consequência das diferenças na composição destes xenobióticos, possuindo um maior ou menor potencial de geração de EROs/ERNs, e/ou indução do processo de sua biotransformação. Desta forma, esta resposta veio confirmar a GST como um biomarcador seguro para avaliação de impacto ambiental de xenobióticos que favorecem o estresse oxidativo (Rodriguez et al., 1991; Livinstone, 1998).

O aumento da atividade da GST no fígado poderia igualmente indicar o desenvolvimento do mecanismo de defesa antioxidante contra hidroperóxidos decorrentes da ação de contaminantes presentes nos efluentes da agroindústria de suínos. De acordo com Oruç et al. (2000), a atividade da GST é dependente de suas diferentes inter-espécies, bem como do tipo de xenobiótico, da concentração e do período de exposição. A ativação do sistema de biotransformação de xenobiontes em resposta à exposição a contaminantes aquáticos já foi largamente demonstrada em vários trabalhos com espécies de peixes (Larsson et al., 2002; Lindesjoo et al., 2002, Ciccotelli, Crippa e Colombo, 1998; Sayeed et al., 2003; Pandey et al., 2003; Wilhem Filho et al., 2001; Hai et al., 1997).

Desta forma, foi possível observar através do presente trabalho, em consequência da exposição de tilápias aos contaminantes presentes em ambas lagoas, um aumento do processo de lipoperoxidação hepática, de fragmentação do DNA em eritrócitos, indução ou a inibição de enzimas antioxidantes hepáticas, alteração na correlação dos níveis hepáticos de glutathione (GSSG/GSH/GT), indicando um forte estresse sofrido pelos animais, e apontando para uma maior toxicidade na exposição dos peixes à lagoa de polimento apesar das diferentes diluições utilizadas. Por outro lado, os biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes demonstraram uma excelente capacidade de diagnosticar a toxicidade inerente às lagoas da agroindústria de suínos.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- As análises físico-químicas mostraram um aumento na concentração de fósforo e nitrogênio total da lagoa anaeróbia para a de polimento; ambas as lagoas apresentaram níveis de nitratos e cloretos mais elevados que o permitido pela resolução 20 do CONAMA/86;
- O teste de toxicidade com *D. magna* mostrou maior toxicidade em exposição à lagoa de polimento; em contrapartida, os resultados de toxicidade com peixes mostraram maior toxicidade na lagoa anaeróbia durante a exposição aguda;
- Os peixes expostos sub-crônicamente às lagoas anaeróbia e polimento apresentaram um acentuado estresse oxidativo;
- Na exposição à lagoa de polimento o sangue das tilápias apresentou genotoxicidade mais persistente nos períodos prolongados de exposição.
- Várias enzimas antioxidantes (GST, GPx, CAT), assim como a lipoperoxidação, mostraram um comportamento bifásico do organismo frente ao estresse oxidativo;
- Aparentemente, o tempo de exposição e os níveis de contaminantes determinaram quantitativamente as respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo e de dano em peixes, sendo esta resposta aparentemente dependente da capacidade funcional do tecido estudado;
- Os biomarcadores de estresse oxidativo, principalmente a estimulação de enzimas antioxidantes em peixes, mostraram-se como ótimos indicadores de poluição das águas avaliadas;

- Os peixes cronicamente expostos a ambas lagoas de tratamento da agroindústria de suínos revelaram respostas adaptativas tecido-específicas para neutralizar o estresse oxidativo.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo e de dano em peixes expostos aos efluentes durante um período maior de exposição, como 120 e 240 dias, no sentido de avaliar a extensão da capacidade compensatória em termos antioxidantes.
- Analisar enzimas da fase I de biotransformação, como citocromo P450, durante todo o período de exposição.
- Avaliar o estresse oxidativo nas sete lagoas da planta de processamento da agroindústria de suínos;
- Avaliar a concentração de nitrito nas águas das lagoas analisadas;
- Realizar análise da fragmentação do DNA em hepatócitos e brânquias;
- Realizar ensaios de micronúcleos em sangue, fígado e brânquias;
- Tentar avaliar um agente que participe na biodegradação de contaminantes existentes em ambas lagoas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS, Associação do Industria Produtora e Exportadora de Carne Suína, **Rev. Suinocultura industrial**. Disponível em [http:// www. suinoculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp](http://www.suinoculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp) , acesso em 25/04/2004.

ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ensaio de toxicidade aguda com peixes**: Ensaio de Ecotoxicologia, Projeto 00:001.044-001.Rio de Janeiro, 2003

ADAMS, S. M. ; MCLEAN, R. B. Estimation of the largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacepede, growth using the liver-somatic index physiological variables. **J. Fish Biol.**, v.26, p.111–126, 1985.

ADAMS, S. M.; BREEK, J. E.; MCLEAN, R. B. Cumulative stress-induced mortality of gizzard shad in a southeastern U.S. reservoir. **Environ. Biol. Fish.**, v.13, p.103–112, 1985.

ADAMS, S. M. et al. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.24, p. 347-360, 1992.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v.105, p.121-126, 1984.

AGUAYO, S. et al. Identification of organic compounds and ecotoxicological assesment of sewage treatment plants (STP) effluents. **Sci. Total Environ.**, In Press, Corrected Proof, Available online 11 May 2004.

AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gener. Subj.**, v. 1519(1), p. 37-48, 2000.

ALMAR, M. M. et al. Organ distribution of glutathione and some glutathione-related enzymatic activities in *Procambarus clarkii*: effect of sex, size and nutritional state. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.89B, p.471–474, 1988a.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standart Methods Examination of Water Wastewater 20th**. Washigton. 1998.

ANDERSON, D. et al. The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen–radical–generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. **Mutat. Res.**, v.307, p.261–271, 1994.

ARMSTRONG, A. N. Review: Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chem. Res. Toxicol.**, v.10, p.2-18, 1997.

AUGUSTO, O. et al. Spin-trapping studies of peroxyntirite decomposition and 3-morpholinosydnoni-mide N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. **Arch. Biochem. Biophys.** v.310, p.118/125, 1994.

BAPTISTA, I. E. Avaliação da Toxicidade de Efluentes Gerados em uma Indústria Têxtil Catarinense. TESE DE MESTRADO. Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFSC, Florianópolis, Brasil, 2001.

BARNES, M. A.; POWER, G.; DOWNER, R. G. Stress-related changes in lake white fish (*Coregonus clupeaformis*) associated with a hydroelectric control structure. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.41, p.1528–1533, 1984.

BELPAEME, K. et al. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout *Salmo trutta fario* using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutag.**, v.11(5), p. 485–492, 1996.

BENASSI, J.C. et al. Avaliação de alguns biomarcadores em tilápias expostas ao efluente de mineração de carvão não remediado e remediado com microesferas de quitosana. Livro de resumos. **Soc. Environ. Toxic. Chem. Amer.-Lat.**, 2003, Buenos Aires.

BEND, J. R.; JAMES, M. O. Xenobiotic metabolism in marine and freshwater species. **Biochem. Biophys. Perspect. Mar. Biol.**, v.4, p.125, 1978.

BETTI, C.; NIGRO, M. The comet assay for the evaluation of the genetic hazard of pollutants in cetaceans—preliminary results on the genotoxic effects of methyl mercury on the bottlenosed dolphin *Tursiops truncatus* lymphocytes in vitro. **Mar. Pollut. Bull.**, v.32, p. 545–548, 1996.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRD, RP.; DRAPER, AH. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol.**, v. 90, p. 105-110, 1984.

BOVERIS A.; CADENAS E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. **Oxyg. Gen. Expres. Cell. Funct.**, v.105, p.1-25, 1997.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Oberly, L.W. (ed.) **Superoxide Dismutase**, v. 2. CRC: Boca Raton, 1982

BROWN, J. A. et al. Impairment of early feeding behaviour of largemouth bass by pentachlorophenol exposure: a preliminary assessment. **Trans. Amer. Fish. Soc.**, v.116, p.71–78, 1987.

CALBERG I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzym.**, v.113, p.484-490, 1985.

CASAN- Companhia Catarinense de Saneamento, Mapa hidrológico de Santa Catarina. Disponível em www.casan.org.br. Acesso em 27/06/2004.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**, 1992.

CHANEY, S. S.; SANCAR, A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.88, p.1346–1360,1996.

CHOW C.K.; HONG C.B. Dietary vitamin e and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. **Toxicol.**, v.180, p.195-207, 2002.

CICCOTELLI, M.; CRIPPA, S.; COLOMBO, A. Bioindicators for toxicity assesment of effluents from a wasterwater treatment plant. **Chemosp.**, v. 37, p. 2823 - 2832, 1998.

COLLINS, R. A.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mut. Res.**, v. 336, p. 69-77, 1995.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Treinamento Prático especializado: Testes de toxicidade com organismos aquáticos de águas continentais. São Paulo, 1988.

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem. Phys. Lipids.** v.72, p.1-56, 1989.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Revisão da Resolução 020/86 - sobre classificação e enquadramento de classes d'água, Brasília, 2003.

COTELLE S.; FÉRARD J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Env. Mol. Mut.**, v.34, p.246-255, 1999.

COUTINHO, Z. **Chapecó - Eldorado do Oeste**. Expressão, Florianópolis, Ano 3, n.35, p. 33-43, 1993.

DE FLORA S.; BAGNASCO M.; ZANACCHI P. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazrads in the marine enviromental, with special reference to the mediterranean sea. **Mut. Res.**, v.320, p.285-292, 1991.

DEPLEDGE, M. H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Nondestructive biomarkers in vertebrates. IN: FOSSI, M.C. & LEONZIO, C. (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, Fl, USA, p. 261-285, 1993.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment, Invertebrates. **Ecotox.**, v.3, p. 161-172, 1994.

DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinats of oxidative stress. **Envirom. Toxicol. Chem.**, v.8, p. 1103 - 1123, 1989.

DI GIULIO, R. T.; HABIG, C.; GALLAGHER, E. P. Effects of black rock harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. **Aquat. Toxicol.**, v.26, p.1–22, 1993.

DI GIULIO, R. T. Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contaminantion. In: Mayes, M.A., Barrons, M.G. (Eds.), **Aqu. Toxic. Risk Assess.** ASTM STP, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, v. 14, p.15–31, 1991.

DI GIULIO, R. T. et al. Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity. **Fundam. Aquat. Toxic. Effects, Environ. Fate Risk Assess.**, RAND, G. M. (ed.) 2ed. Taylor & Francis. p.523-560, 1995.

DIN - Deutsches Institut für Normung. Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Fishen über Verdünnungsstufen, Norma DIN 38412 Teil 31. Berlin : DIN (L31), 1989.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Review: Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog. Lipid Res.**, v. 43, p. 200 - 227, 2004.

DUTHIE, G. G.; ARTHUR, J. R. Free radicals and calcium homeostasis: Relevance to malignant hyperthermia?. **Free Radic. Biol. Med.**, v.14, p. 435-442, 1993.

ELLIS, G. et al. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. **Clin. Biochem.**, v.31, p.195-220, 1998.

EPP, O.; LADENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2nm resolution. **Eur. J. Biochem.**, v.133, p.51-69, 1983.

EXPRESSÃO, **Corrida Frenética**, Florianópolis: Az Comunicação, Ano 5, n.57, p. 36 - 44, 1995.

FABER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMAN, J. B. Biology of disease.mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab. Invest.**, v.62, p.670-8, 1990.

FATIMA, M. et al. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. **Aquat. Toxicol.**, v. 49, p. 243-250, 2000.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FOLMAR L. C. et al. Serum chemistry and histopatological evaluations of brown bulheads (*Ameiurus nebulosus*) from Buffalo and Niagara rivers, New York. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.25, p.298-303, 1993.

FOURNIER, D. et al. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 1840-1845, 1992.

FRANCESCUTTI, D.; BALDWIN, J.; LEE, L.; MUTUS, B. Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site. **Protein Eng.**,v. 9,p.189-194, 1996.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, v.47, p. 412-426, 1982.

FRELLO, C. P. Avaliação da toxicidade aguda do agrotóxico Carbofuran utilizando reativos biológicos: *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna*. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 1998.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.893, p.13–18,1999.

GARCIA, T.; BEIRITH, B. Quantificação da contaminação dos rios pela biomassa da suinocultura em Santa Catarina (região oeste). Estudo da comprovação da poluição dos mananciais de abastecimentos públicos. Chapecó, SC. MONOGRAFIA. Universidade do Oeste de Santa Catarina, 1996.

GEDIK, C. M.; EWEN, S. W.; COLLINS, R. A. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV–C damage and its repair in human cells. **Int. J. Radiat. Biol.**, v.62, p.313–320, 1992.

GLADWIN, M. T. et al. Role of circulating nitrite and s-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.97, p. 11482-11487, 2000.

GUIVANT, J. Conflitos e negociações nas políticas de controle ambiental: o caso da suinocultura em Santa Catarina. **Amb. Societ.**, v..2, p. 101-123, 1998.

HAI, D. Q.; VARGA, S. I.; MATKOVICS, B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.117C, p.83 - 88, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, (3° ed) Oxford.Ellis, 1999.

HANDY R. D. Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrate. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.107C, p.171-184, 1994.

HASSPIELER, B. M.; BEHAR, J. V.; DIGIULIO, R. T. Glutathione dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bulhead (*Ameirus nebulosus*). **Ecot. Environ. Saf.**, v. 28, p. 82 - 90, 1994.

HONTELA A. et al. Impaired cortisol stress respos in fish from environments polluted by PHAs, PCBs and mercury. **Arch Environ. Contam. Toxicol.**, v.22, pg.278-283, 1992.

HOTCHLISS, J. H. et al. Nitrate, nitrite, and N-Nitroso compounds. Food safety and biological implications. In: FINLEY, L.W., ROBINSON, S.F., ARMSTRONG, D.J. (eds), **Food Saf. Asses.** ACS Symposium Series, American Chemical Society., v. 484, p. 400-418, 1992.

HUANG, C. et al. Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 134B, p. 265 - 270, 2003.

HUGGETT, R. J. et al. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress, ed. Lewis publishers, p.282, 1989.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Suinocultura, Setorial 1997. Disponível em: www.suinoculturaindustrial.com.br. Acesso em 25/06/2004.

JENSEN, E. B. Uptake and effects of nitrite and nitrate in animals. In: Walsh, P.J., Wright, P. (Eds), Nitrogen metabolism and excretion. CRC Press, Boca Raton, p. 289-303, 1995.

KAPPUS H. Oxidative stress in chemical toxicity. **Arch. Toxicol.**, v. 60, p. 144–149, 1987.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities from glutathione S-transferase. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183-6188, 1976.

KELLING, P. L.; SMITH, L. L. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. **Biochem. Pharmacol.**, v. 31, p. 3243-49, 1982.

KENG, M. et al. Peroxynitrite formation and decreased catalase activity in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. **Mol. Med.**, v. 6, p. 779-792, 2000.

KIRLIN, W. G. et al. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 1208–1218, 1999.

KOPPEN, G.; VERSCHAEVE, L. The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutat. Res.**, v.360, p.193–200, 1996.

LARSSON D. G. et al. Studies of masculinization, detoxification, and oxidative stress responses in guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.52, p.13-20, 2002.

LAUER, T. et.al., Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 12814-12819, 2001.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo, eds. Sarvier, 1986

LEMAIRE, P.; FORLIN, L.; LIVINGSTONE, D. R. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene, b-naphtho.avone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.**, v.36, p. 141–160, 1996.

LEMAIRE, P.; LIVINGSTONE, D. R. Pro-oxidant antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. **Trends Comp. Biochem. Physiol.**, v.1, p.1119–1150, 1993.

LEWIS, W. M.; MORRIS, D. P. Toxicity of nitrite to fish: a review. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 115, p. 183-195, 1986.

LIMA, P.L. et al. Detection of dna damage in haemocytes of mytella guaynensis mussel from two mangroves on santa catarina island, brazil, using comet assay. **Genet. Molec. Biol.**, v. 26, n. 2º, p. 124, 2003.

- LINDESJOO, E. et al. Biomarkers responses and resin acids in fish chronically exposed to effluents from a total chlorine-free pulp mill during regular production. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.53, p.238-247, 2002.
- LIVINSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 43 - 49, 1998.
- MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS M.A. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induces by the overflow of pulp mill and secondary-terated effluents on *Anguilla anguilla* L.. **Ecotox. and Environ Saf.**, v.55, p.126-137, 2003.
- MARTINEZ, G.; LIVINGSTONE, D.R. Benzo-a-pyrene-dione-stimulated oxyradical production by microsomes of digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis* L.. **Mar. Environ. Res.**, v.39, p.185–189, 1995.
- MARTINEZ, P. G. et al. Nitrofurantoin-stimulated reactive oxygen species production and genotoxicity in digestive gland microsomes and cytosol of the common mussel *Mytilus edulis* L.. **Toxicol. Appl. Pharm.**, v.131, p. 332–341, 1995.
- MATHER-MIHAICH, E.; DI GUILIO, R. T. Oxidant, mixed-function oxidase and peroximal responses in channel cat.sh exposed to bleached kraft mill effluent. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.20, p. 391–397, 1991.
- NACCI, D. et al. Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand-breaks in marine bivalves. **Mar. Environ. Res.**, v.33, p.83–100, 1992.
- NAVARRO, A. V. et al. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewater. **Environ. Internat.**, v. 25, p. 619-624, 1999.
- NIGRO, M. et al. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. **Marin. Environ. Res.**, v. 54, p. 517 - 520, 2002.
- OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analy. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.
- OIKARI, A.; NIITTYLA, J. Subacute physiological effects of bleached kraft mill effluent (BKME) on the liver of trout, *Salmo gairdneri*. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.10, p. 159 - 172, 1985.
- ORUÇ, EO.; UNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127C, p. 291-296, 2000.
- PADMAJA, S.; SQUADRIO, GL.; PRYOR, WA. Inactivation of glutatione peroxidase by peroxynitrite. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 349, p. 1-6, 1998.
- PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Sci. Total Environ.**, v.309, p. 105 - 115, 2003.

- PANDRANGI, R. et al. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 26, p. 345 - 356, 1995.
- PEDROSA, RC. et al. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. **Redox Report.**, v.6, p. 265-270, 2001.
- PEDROSA, R. C. et al. Effect of bleaching *Eucalyptus* pulp effluent from a Brazilian industry on the expression of cytochrome P4501A1 of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Proc. Fifth Braz.Symp.Chem.Lignins Wood Comp.**, p. 449-453, 1997.
- PEETZ, V. S. et al. Cadeia produtiva da carne suína no Estado de São Paulo. São Paulo: IEA/SAA/SP. p.57, 1996.
- PELTIER, W.; WEBER, C.I. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-850/013. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency; p.140, 1985.
- PRYOR, WA.; SQUADRITO, GL. The chemistry of peroxyxynitrit: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am. J. Physiol.**,v. 268, p. L699-722, 1995.
- RALPH, S. et al. Alkaline single cell gel comet assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. **Environ. Mol. Mutag.**, v.28, p.112–120, 1996.
- REGOLI F. et. al. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Mar. Environ. Res.**, v.54, p.419-423, 2002.
- REGOLI, F. et al. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marina environment. **Sci. Total Environ.**, v. 289, p. 205-211, 2002.
- REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquat. Toxic.**, v. 40, p. 375 - 392, 1998.
- RIBEIRO, L. et al. Estresse oxidativo em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao efluente de industria têxtil. In: EVALDO L. G. ESPÍNDOLA, CLARICE M. R. B. PASCHOAL, ODETE ROCHA, MARIA B. C. BOHRER, ABÍLIO L. O. NETO (eds.), **Ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2000.
- RICARD, A. C. et al. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 34, p. 377–381, 1998.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A. et al. Biochemical effects of environmental pollution in fishes from Spanish south-Atlantic littoral. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 19, p. 301s, 1991.
- RODRÍGUEZ-ARIZA, A. et al. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish litoral. **Sci. Total Environ.**, (Supl.), p. 109-116, 1993a.
- RODRÍGUEZ-ARIZA, A. et al. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted litoral areas. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 50, p. 2568-2573, 1993b.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J. Chromat. B.**, v. 722, p. 225-254, 1999.

ROPPA, L. Situação atual e tendências da suinocultura mundial. In: Simpósio brasileiro de ambiência e qualidade na produção industrial de suínos, 1, 1999, Piracicaba. *Anais*. Piracicaba: NUPEA/ESALQ/USP, p.196-206, 1999.

ROSA, A. B. et al. Oxidative stress in fish species exposed in situ to effluents of a brazilian pulp and paper industry. Livro de resumos. **VI Congresso Setac Latinoamerica**, 2003, Buenos Aires. pg. 72.

ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents: Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. **Pharmac. Therap.**, v.37, p.231-249, 1988.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 56, p. 295 - 301, 2003.

SCHRECK, C. B. Physiological, behavioral, and performance indicators of stress. **Amer. Fish. Soc. Sympos.**, v.8, p.29-37, 1990.

SECEX- **Revista Suinocultura industrial**. Disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp> , acesso em 25/04/2004.

SHI, H. et al. Formation of phospholipid hydroperoxides and its inhibition by alpha-tocopherol in rat brain synaptosomes induced by peroxyxynitrite. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 257, p. 651-656, 1999.

SHIMURA, R. et al. Aquatic animal research in space station and its issues — focus on support technology on nitrate toxicity. **Adv. Space Res.**, v.30, p. 803-808, 2002.

SHUGART, L. Biological monitoring: testing for genotoxicity, IN: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. Eds. Biomarkers of Environmental Contamination, Lewis Publishers. Chelsea, p. 217-227, 1990.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Europ. J. Biochem.**, v.215, p.213-219, 1993.

SILVA, A. M. et al. Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxide formation on tissues of rats. **Environ. Poll.**, v. 105, p. 243-9, 1999.

SINA, J. F. et al Evaluation of the alkaline elution rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic mutagenic potential. **Mutat. Res.**, v. 113, p. 357-391, 1983.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v. 175, p.184-191, 1988.

SLOOFF, W. et al. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface water in the Netherlands. **Aquat. Toxic.**, v.4, p.1-14, 1983.

STEGEMAN, JJ.; BROUMER, M.; DI GIULIO, RT. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effects. In: HUGGET, RA.; KIMERLE, PM.; MEHRLE Jr, PM.; BERGMAN, HL. (Eds.), Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress. Lewis Publishers. Boca Raton, FL., p 235-335, 1992.

STEIN, J. E. et al. ^{32}P -Postlabeling analysis of DNA adduct formation and persistence in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to Benzo(a)-pyrene and 7H-dibenzo(c,g)carbazole. **Chem. Biol. Interact.**, v.88, p.55–69, 1993.

STONE, K. C. et al. Impact of swine waste application on ground and stream water quality in an eastern coastal plain watershed. **Trans. ASAE.**, v. 41, p. 1665 –1670, 1998.

TESTA, V. M. et al. O desenvolvimento sustentável do Oeste Catarinense. **Empresa de Pesquisa Agropecuária e extensão rural de Santa Catarina**, Florianópolis, p. 247, 1996.

THOMANN, R. V. E MULLER, J. A. Principles of Surface Water Quality Modeling and Control. Harper & Row, New York, 1987

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, v.27, p.502-522, 1969.

TOGUYENI, A. et al. Feeding behaviour and food utilisation in tilápia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiol. Behav.**, v. 62, p. 273-9, 1997.

TORRES, M. A. et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Mar. Poll. Bulletin.**, v. 44, p. 923-932, 2002.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci.**, v.51, p. 1083 - 1094, 1992.

USDA - Departamento da agricultura dos Estados Unidos, **Revista Suinocultura industrial** disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp>. acesso em 25/04/2004.

VAN BLADEREN, P. J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **Chem. Biol. Interact.**, v.129, p. 61-76, 2000.

VAN DYKE, K. The possible role of peroxynitrite in Alzheimer's disease: a simple hypothesis that could be tested more thoroughly. **Med. Hypotheses**, v.48, p. 375-389, 1997.

WALLACE, DC. et al. Mitochondrial biology, degenerative disease and aging. **Biofact.**, v. 7, p. 187-190, 1998.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses - A comparative approach. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1735-1742, 1996.

WILHELM FILHO, D. et al. The effect of pulp mill effluent on two fish species. **Fifth Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp.**, 1997.

WILHELM FILHO, D. et al. Comparative antioxidant defenses in vertebrates-emphasis on fish and mammals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.7, p.33-45, 2000.

WILHELM FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar (*Geophagus brasiliensis*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 719-726, 2001.

WILLEMSE, J. J.; MARKUS-SILVIS, L.; KETTING, G. H. Morphological effects of stress in cultured eels, *Anguilla anguilla* (L.). **Aquat.**, v. 36, p.193–201, 1984.

WINSTON, GW. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.100, p.173-176, 1991.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquat. Toxicol.**, v.19, p.137–161, 1991.

ZHANG, J. et al. Effects of chronic exposure of 2,4-diclorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosp.**, v. 55, p. 167-174, 2004.

ZWEIER, H.; SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1411, p. 250-252, 1999.